

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELO BUENO BATISTA

EFEITO DA PROTEÍNA FNR NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM
Herbaspirillum seropedicae

CURITIBA
2008

MARCELO BUENO BATISTA

EFEITO DA PROTEÍNA FNR NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM
Herbaspirillum seropedicae

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito
parcial à obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas
pela Universidade Federal do
Paraná.**

**Orientadores: Rose Adele Monteiro
Emanuel M de Souza**

Co-orientadora: Michele Z. T. Sfeir

**CURITIBA
2008**

TERMO DE APROVAÇÃO

MARCELO BUENO BATISTA

EFEITO DA PROTEÍNA FNR NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM
Herbaspirillum seropedicae

Trabalho de conclusão de curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora.

Orientadora: Profª Drª. Rose Adele Monteiro
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Profª Drª Maria Berenice Reynaud Steffens
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Profª Drª Luiza Maria de Araújo
Departamento Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Curitiba, 15 de dezembro de 2008.

Ao meu irmão,
Marco Aurélio Bueno Batista (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalhar no Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio;

Aos Professores Emanuel Maltempi de Souza e Rose Adele Monteiro pela confiança depositada e também pela orientação neste trabalho;

Ao Valter, Rose Prado e Dona Jú pela assistência à realização deste trabalho;

A todos demais Professores do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio pela ajuda, discussões, ensinamento e dicas;

A todos os colegas de laboratório que sempre auxiliaram muito no esclarecimento de dúvidas e também com o uso de alguns aparelhos;

Aos colegas da iniciação científica;

A todos amigos da graduação por terem compartilhado muitos momentos em situações diversas, fossem elas de euforia ou aflição;

À minha família, que me apoiou tornando possível a concretização do sonho de ser Biólogo.

O primeiro pecado da humanidade foi a fé,
a primeira virtude foi a dúvida.

Carl Sagan

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	16
2.2 COMPLEXO ENZIMÁTICO DA NITROGENASE	17
2.3 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	18
2.4 A PROTEÍNA NifA E A REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	19
2.5 A PROTEÍNA FNR E A FAMÍLIA Crp-Fnr DOS REGULADORES TRANSCRICIONAIS	22
2.6 O PAPEL DA PROTEÍNA FNR NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM <i>Klebsiella pneumoniae</i>	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	30
3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO	31
3.3 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS EM PEQUENA ESCALA	33
3.4 ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE	34
3.5 CLIVAGEM DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	34
3.6 PREPARO DOS VETORES DE CLONAGEM	34
3.7 LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA A VETORES	35
3.8 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO	35
3.9 TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS POR CONJUGAÇÃO	36
3.10 SEQUENCIAMENTO DE DNA	37
3.11 AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA POR PCR	38
3.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE	39
3.13 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	40
3.14 ANÁLISE <i>in silico</i>	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DA REGIÃO DOS GENES <i>fnr</i> DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> NO GENOMA	43
4.2 ANÁLISE <i>in silico</i> DAS PROTEÍNAS FNR DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	49

4.3 CONSTRUÇÃO DO MODELO ESTRUTURAL TEÓRICO PARA	
AS PROTEÍNAS FNR ₁ , FNR ₂ E FNR ₃ DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	56
4.4 CLONAGEM DOS GENES <i>fnr1</i> , <i>fnr2</i> e <i>fnr3</i> de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	68
4.5 INSERÇÃO DO CASSETE DE CANAMICINA NOS GENES	
<i>fnr1</i> , <i>fnr2</i> e <i>fnr3</i> DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	73
4.6 CONSTRUÇÃO DOS MUTANTES CROMOSSOMAIIS	
DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (SmR1) NOS GENES <i>fnr1</i> E <i>fnr2</i>	78
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE NITROGENASE	
DAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. seropedicae</i> NO GENE <i>fnr2</i>	80
5 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo esquemático dos domínios modulares da proteína NifA de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	20
Figura 2 - Região promotora do gene <i>fnr</i> de <i>Escherichia coli</i>	25
Figura 3 - . Prováveis regiões de ligação de proteínas que participam da regulação negativa da expressão do promotor <i>fnr</i> de <i>Escherichia coli</i>	26
Figura 4 - Organização estrutural da região do gene <i>fnr1</i> no genoma de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	43
Figura 5 - Organização estrutural da região dos genes <i>fix</i> de <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	44
Figura 6 - Busca de ORFs na região de 33165 a 32970 pb no genoma de <i>H.seropedicae</i>	45
Figura 7 - Organização estrutural da região do gene <i>fnr2</i> no genoma de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	46
Figura 8 - Organização estrutural da região do gene <i>fnr3</i> no genoma de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	46
Figura 9 - Padrão de vizinhança gênica gerado pelo banco de dados STRING.....	47
Figura 10 - Organização estrutural da região dos genes ml19676, ml19677 e ml19676 de <i>Mesorhizobium loti</i>	48
Figura 11 - Alinhamento entre as três proteínas análogas a FNR de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e as proteínas FNR de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	51
Figura 12 - Alinhamento entre as regiões C-terminal das três proteínas análogas a FNR de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e as proteínas CAP e FNR de <i>Escherichia coli</i> e FNR de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	52
Figura 13 - Alinhamento entre as três proteínas análogas a FNR de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e outras proteínas FNR.....	54
Figura 14 - Modelo estrutural tri-dimensional do monômero da proteína FNR ₁ de <i>H. seropedicae</i>	57
Figura 15 - Modelo estrutural tri-dimensional do monômero da proteína FNR ₂ de <i>H. seropedicae</i>	58

Figura 16 - Modelo estrutural tri-dimensional do monômero da proteína FNR ₃ de <i>H. seropedicae</i>	59
Figura 17 - Sobreposição entre as proteínas FNR de <i>H. seropedicae</i> com a proteína CAP de <i>E. coli</i>	61
Figura 18 - Análise da qualidade do modelo estrutural da proteína FNR1 de <i>H. seropedicae</i>	64
Figura 19 - Análise da qualidade do modelo estrutural da proteína FNR2 de <i>H. seropedicae</i>	65
Figura 20 - Análise da qualidade do modelo estrutural da proteína FNR3 de <i>H. seropedicae</i>	66
Figura 21 - Perfil eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, dos produtos de amplificação dos genes <i>fnr</i> de <i>H. seropedicae</i>	68
Figura 22 - Esquema de clonagem dos genes <i>fnr</i> de <i>H. seropedicae</i> no vetor pGEM-T easy.....	69
Figura 23 - Esquema de clonagem dos genes <i>fnr</i> de <i>H. seropedicae</i> no vetor pCR2.1.....	69
Figura 24 - Perfil de restrição dos plasmídeos pMBB1, pMBB2 e pMBB3 com a enzima EcoRI.....	70
Figura 25 - Análise de restrição dos plasmídeos pMBB4, pMBB5 e pMBB6 com a enzima EcoRI.....	70
Figura 26 - Preparo dos plasmídeos para subclonagem.....	71
Figura 27 - Esquema de subclonagem dos genes <i>fnr</i> de <i>H. seropedicae</i> no vetor pSUP202, para obtenção dos plasmídeos pSUPfnr	72
Figura 28 - Padrão de restrição dos plasmídeos pSUPfnr1, pSUPfnr2 e pSUPfnr3 com as enzimas SphI e Sall.....	72
Figura 29 - Preparo dos vetores para inserção do cassete de canamicina.....	73
Figura 30 - Perfil de restrição com a enzima PstI para confirmação da entrada do cassete de canamicina nos genes <i>fnr</i>	74
Figura 31 - Amplificação dos genes <i>fnr</i> por PCR para confirmação da entrada do cassete de canamicina nos genes <i>fnr</i>	75
Figura 32 - Padrão de restrição de plasmídeos pSUPfnr1Km com as enzimas BamHI e Sall.....	76
Figura 33 - Mapa de restrição do plasmídeo pSUPfnr1KmF.....	77

Figura 34 - Análise de restrição do plasmídeo pSUPfnr1KmF para confirmação da entrada do cassete de canamicina no gene <i>fnr1</i>	77
Figura 35 - Amplificação dos genes <i>fnr1</i> por PCR, a partir de DNA cromossomal, para verificação de recombinação homóloga	78
Figura 36 - Amplificação dos genes <i>fnr2</i> por PCR, a partir de DNA cromossomal, para verificação de recombinação homóloga.....	79
Figura 37 – Gráfico de atividade da nitrogenase nas estirpes de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> mutantes no gene <i>fnr2</i>	80
Figura 38 - Região promotora do gene <i>fnr2</i> de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estirpes de <i>Escherichia coli</i> utilizadas.....	20
Tabela 2 - Estirpes de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> utilizadas.....	29
Tabela 3 – Plasmídeos utilizados.....	30
Tabela 4 – Composição do meio NFb-malato.....	31
Tabela 5 – Composição do meio LB (Luria Bertani).....	32
Tabela 6 – Composição do meio SOB.....	32
Tabela 7 – Relação dos antibióticos utilizados para seleção.....	33
Tabela 8 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR.....	38
Tabela 9 – Identidade entre as proteínas FNR de <i>H. seropedicae</i> , <i>E. coli</i> e <i>K.pneumoniae</i> com a proteína CAP de <i>E.coli</i>	62
Tabela 10 - Comparação das médias de atividade de nitrogenase nas estirpes de <i>H. seropedicae</i> mutantes no gene <i>fnr2</i> utilizando-se o Teste t	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	=	s 5' difosfato de adenosina
AMP	=	5' monofosfato de adenosina
Amp	=	Ampicilina
ATP	=	5' trifosfato de adenosina
BSA	=	Do inglês “bovine serum albumin”
CAP	=	Do inglês “catabolite activator protein”
Cm	=	Cloranfenicol
CRP	=	Do inglês “Cyclic AMP receptor protein”
D.O.	=	Densidade ótica
DNA	=	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	=	5' trifosfato de 2' desoxinucleotídeo
e ⁻	=	Elétron
EDTA	=	Ácido etilenodiamino-tetra-acético
F	=	Faraday
FAD	=	Flavina-adenina dinucleotídeo
FADH ₂	=	Flavina-adenina dinucleotídeo reduzido
FBN	=	Fixação biológica de nitrogênio
FNR	=	do inglês “fumarate and nitrate reductase
IHF	=	Fator de integração do hospedeiro
kΩ	=	Quilohms
kb	=	Quilopares de base
kDa	=	Quilodalton
Km	=	Canamicina
kV	=	Quilovolts
L	=	Litro
Nal	=	Ácido nalidíxico
N ₂ ase	=	Nitrogenase
pb	=	Pares de base nucleotídeos
PCR	=	Reação em cadeia da polimerase
Pi	=	Fosfato inorgânico
RBS	=	Sítio de ligação para ribossomo
rpm	=	Rotações por minuto
SDS	=	Dodecilsulfato de sódio
Sm	=	Estreptomicina
Tc	=	Tetraciclina
Tris	=	Tris(hidroximetil)-aminometano
U	=	Unidade enzimática
X-gal	=	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo

RESUMO

O interesse pelo estudo dos organismos fixadores de nitrogênio, os diazotrofos, tem aumentado nos últimos anos. Sendo biofertilizantes em potencial, estes organismos, constituem uma alternativa à utilização dos fertilizantes nitrogenados, que encarecem a produção agrícola e ainda podem provocar sérios danos ecológicos. A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é um processo amplamente distribuído em Bacteria e Archaea. *Herbaspirillum seropedicae* é um diazotrofo endofítico, pertencente a classe β das Proteobactérias encontrado em gramíneas importantes para a agricultura, como trigo, arroz, sorgo e cana-de-açúcar. O processo de redução de N_2 atmosférico a amônio, é catalisado pelo complexo enzimático nitrogenase, codificada pelos genes *nif*, os quais têm sua transcrição ativada pela proteína NifA. A atividade da proteína NifA é controlada em resposta aos níveis de oxigênio e amônio. A resposta a íons amônio ocorre por meio de seu domínio N-terminal. Já o mecanismo de resposta ao oxigênio, ainda carece de uma boa compreensão, muito embora, haja a suspeita de que a NifA, possa monitorar diretamente o oxigênio intracelular por meio de um motivo de cisteínas, localizado entre os domínios central e C-terminal da proteína. A partir de evidências da participação da proteína FNR no metabolismo do nitrogênio em *Klebsiella pneumoniae* (GRABBE, KLOPROGGE E SCHMITZ, 2001), em 2003 Monteiro e colaboradores obtiveram resultados que indicam que a sensibilidade da NifA N-truncada de *Herbaspirillum seropedicae* ao oxigênio está relacionada com a proteína FNR de *Escherichia coli*. Também em 2003, Raeder, sugeriu que mutantes cromossômicos de *H. seropedicae* nos genes *fnr1* e *fnr2* tinham atividade de nitrogenase diminuída. O fator de transcrição FNR tem um importante papel no monitoramento dos níveis de oxigênio em diversos organismos. Em *Herbaspirillum seropedicae*, a proteína FNR, é uma forte candidata à participação na via de regulação da NifA em resposta ao oxigênio. O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito da proteína FNR sobre a fixação de nitrogênio em *H. seropedicae*. Para isso foram construídos mutantes de *Herbaspirillum seropedicae* nos genes *fnr1* e *fnr2*. Depois da amplificação dos genes por PCR, estes foram clonados no vetor pGEM-T easy. Após a confirmação da clonagem por meio de padrão de restrição e sequenciamento de DNA, os genes foram subclonados no vetor suicida pSUP202, e então foi inserido um cassete de DNA que confere resistência ao antibiótico canamicina nos genes *fnr*. Estes plasmídeos foram então transferidos para o *H. seropedicae* (SmR1) e possíveis mutantes gerados por recombinação homóloga foram isolados. Os resultados preliminares, indicando que mutantes *fnr2*- têm atividade de nitrogenase diminuída, sugerem que a proteína FNR₂ de *Herbaspirillum seropedicae* possa estar envolvida na fixação biológica de nitrogênio neste organismo. Além disso, foi encontrado na região promotora do gene *fnr2* de *H. seropedicae* um provável promotor σ^{54} e uma provável *upstream activator sequence* para a proteína NifA, reforçando a hipótese da participação deste gene no metabolismo do nitrogênio. Devido ao envolvimento global da proteína FNR no metabolismo celular do oxigênio em diversos organismos, novos experimentos precisam ser realizados para determinação do papel proteína FNR na regulação da FBN neste organismo.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*. Fixação Biológica de Nitrogênio. FNR.

1 INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) tem grande importância para o meio ambiente e para a agricultura, por isso é um processo que vem sendo amplamente estudado. Os organismos capazes de fixar nitrogênio podem ser utilizados na agricultura, aumentando lucros e diminuindo impactos ambientais. A FBN consiste na redução de nitrogênio atmosférico a amônia por um pequeno grupo de procariotos, os diazotrofos. Este processo é energeticamente muito custoso para a célula e por isso rigidamente regulado tanto na síntese, quanto na atividade da enzima nitrogenase (FU & BURRIS, 1989). Devido a sua importância, sob o ponto de vista biológico e também sob o prisma dos potenciais benefícios econômicos que a compreensão deste processo de regulação pode permitir, as pesquisas feitas na atualidade com os organismos diazotrofos, têm sido focadas na compreensão da regulação do processo de FBN, nos mecanismos de interação planta-bactéria e também em estudos de aumento de produtividade e biomassa de plantas inoculadas com diversos organismos diazotrofos.

1.1 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Baseado no grande interesse a cerca do estudo do diazotrofo endofítico, *Herbaspirillum seropedicae*, nos últimos anos, devido ao seu alto potencial de utilização como biofertilizante (DOBEREINER *et al.*, 2000) e em proposições de que possa haver um envolvimento da proteína FNR no processo de regulação da fixação biológica de nitrogênio nesse organismo (MONTEIRO *et al.*, 2003), este trabalho teve como objetivo geral determinar o efeito das três proteínas análogas a FNR encontradas em *Herbaspirillum seropedicae*, sobre a fixação biológica de nitrogênio neste organismo. Tendo em vista este objetivo principal, teve-se também como objetivos específicos:

- Análise *in silico* dos genes *fnr1*, *fnr2* e *fnr3* de *Herbaspirillum seropedicae*;
- Clonagem dos genes *fnr1*, *fnr2* e *fnr3* de *Herbaspirillum seropedicae*;

- Construção de mutantes de *Herbaspirillum seropedicae* nos genes *fnr1*, *fnr2* e *fnr3*;
- Determinação da atividade da nitrogenase nestes mutantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio é parte essencial de muitas biomoléculas que constituem a base de todas as formas de vida, como proteínas e ácidos nucleicos. O nitrogênio molecular representa cerca de 80% da composição da atmosfera terrestre. Porém, em sua forma gasosa, não pode ser utilizado diretamente pela maioria dos seres vivos (HUBBELL & KIDDER, 2003). Para ser incorporado a um sistema biológico, o nitrogênio deve ser combinado com o elemento hidrogênio para formar NH_3 em um processo denominado de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (BRILL, 1977). Alguns organismos procariotos são capazes de fixar nitrogênio e estão amplamente distribuídos entre Bacteria e Archaea (BURRIS, 1991; YOUNG, 1992). Aos organismos capazes de realizar a FBN deu-se o nome de diazotrofos (YOUNG, 1992).

A disponibilidade de nitrogênio fixado é normalmente um fator limitante no crescimento de microrganismos, plantas e animais (BURRIS, 1991). Na agricultura a produtividade é usualmente limitada pela quantidade de nitrogênio fixado disponível. A fixação biológica de nitrogênio contribui com aproximadamente a metade do total de nitrogênio fixado na agricultura global, sendo o restante derivado de fertilizantes nitrogenados produzidos quimicamente através da síntese de amônia pelo processo de Haber-Bosch (SMITH, 2002), um processo muito caro e que envolve a queima de combustíveis fósseis (BRILL, 1977).

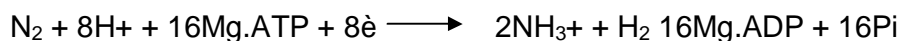
A utilização de fertilizantes nitrogenados encarece a produção agrícola, pois estes são os mais caros entre os fertilizantes, e ainda porque cerca de 50% do total aplicado é perdido pela ação de chuvas, erosão e da atividade bacteriana (PEDROSA, 1987). Além disso, o uso de fertilizantes nitrogenados tem sérias implicações ecológicas, como por exemplo, a emissão de óxidos

nitrosos tóxicos, a eutrofização de lagos e rios e a acidificação do solo (DIXON e KAHN, 2004).

Bactérias diazotróficas podem contribuir substancialmente para a nutrição de nitrogênio da planta, diminuindo os custos da produção agrícola e também impactos ambientais. Diversas bactérias fixadoras de nitrogênio colonizam o interior da planta, podendo fixar o nitrogênio e transferi-lo diretamente para os tecidos vegetais. Em cultivos de cana de açúcar a fixação biológica de nitrogênio pode contribuir com até 150kg de nitrogênio fixado por ano por hectare de terra cultivada. No Brasil, culturas de cana-de-açúcar têm sido cultivadas por séculos sem necessidade de adição de grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados, devido a contribuição da FBN (DOBEREINER *et al.*, 2000).

2.2 COMPLEXO ENZIMÁTICO DA NITROGENASE

A fixação biológica de nitrogênio é o processo de redução do N_2 a NH_3 catalisado pelo complexo enzimático da nitrogenase (BURRIS, 1991). A redução de N_2 a NH_3 pela nitrogenase requer grande quantidade de energia obtida por hidrólise de $MgATP$ a $MgADP + Pi$. Na ausência de nitrogênio fixado, a enzima funciona como uma hidrogenase dependente de ATP e reduz prótons a H_2 (THORNELEY, 2001). A estequiometria da reação catalisada pela nitrogenase é representada como segue: (BURRIS, 1991)



O complexo da nitrogenase é formado por duas metaloproteínas: a proteína ferro ou dinitrogenase redutase e a proteína molibdênio-ferro ou dinitrogenase. A proteína ferro é um homodímero constituído de duas subunidades gama idênticas com massa molecular entre 57 e 72 kDa e contendo um núcleo $4Fe-4S$ ancorado entre as duas subunidades. A proteína molibdênio-ferro é uma proteína tetramérica, com massa molecular entre 200 e 250 kDa, contendo 2 átomos de molibdênio e aproximadamente 33 átomos de ferro. Ela contém dois grupamentos metalosulfúricos: o grupamento P [$8Fe - 7S$] e o grupamento Mo [$7Fe: 9S$] (SMITH, 2002). A nitrogenase é versátil (BURRIS, 1991), além do nitrogênio ela reduz uma variedade de substratos que contém tripla ligação terminal carbono-carbono ou carbono-nitrogênio,

como o acetileno, ácido cianídrico, óxido nitroso, cianetos e isocianetos (EADY & POSTGATE, 1974).

2.3 *Herbaspirillum seropedicae*

O gênero *Herbaspirillum* spp compreende membros da classe das β proteobacterias, que inclui, além de *Herbaspirillum* spp, outros gêneros de bactérias que vivem em associação com plantas, tais como os gêneros *Azoarcus*, *Burkholderia* ou *Ralstonia*. (SCHIMID, BALDANI e HARTMANN, 2006). O gênero *Herbaspirillum* inclui cinco espécies conhecidas, que através de análises filogenéticas moleculares baseadas em 16S-rDNA, constituem um grupo bastante relacionado dentro de β -Proteobacteria (SCHIMID, BALDANI e HARTMANN, 2006). O gênero foi assim denominado por apresentar bactérias em forma de espiral encontradas em associação com plantas herbáceas (BALDANI *et al.*, 1986).

H. seropedicae, isolado em 1986 por BALDANI e colaboradores na cidade de Seropédica, Rio de Janeiro, é a espécie mais estudada de seu gênero, devido ao fato de ser um diazotrofo que promove o crescimento de plantas, com grande potencial de aplicação como biofertilizante. O estudo desse organismo tem sido focado no metabolismo do nitrogênio, especialmente na organização molecular e atividade dos genes envolvidos na fixação de nitrogênio e na assimilação de amônio (SCHIMID, BALDANI e HARTMANN, 2006).

Herbaspirillum seropedicae é um diazotrofo endofítico encontrado no interior de gramíneas importantes na agricultura como trigo, milho, arroz, sorgo, cana de açúcar, algumas espécies de gramíneas forrageiras e palmeiras oleaginosas (BALDANI *et al.*, 1986; BODDEY *et al.*, 1995; PIMENTEL *et al.*, 1991; OLIVARES *et al.*, 1996; JAMES *et al.*, 1998). *H. seropedicae* é uma bactéria gram-negativa, geralmente vibrióide, algumas vezes helicoidal e com muita mobilidade. Apresenta 0,6 a 0,7 μ m de diâmetro e 1,5 a 5 μ m de comprimento, podendo possuir de um a três flagelos em um ou ambos os pólos da célula (BALDANI *et al.*, 1986). É um microrganismo capaz de fixar nitrogênio sob condições microaeróbicas e em uma ampla faixa de pH (5,3 a 8,0) (BALDANI *et al.*, 1986).

Por meio de experimentos nos quais *H. seropedicae* foi inoculado em solo desprovido de raízes, demonstrou-se que *H. seropedicae* é um organismo endofítico obrigatório. Devido a essa característica, em contraste com diazotrofos da rizosfera que competem com a microflora do solo por fontes de carbono, *H. seropedicae* vive em um ambiente mais uniforme e protegido, o interior dos tecidos da planta, o que pode explicar sua alta contribuição na fixação biológica do nitrogênio (OLIVARES *et al.*, 1996).

Além de converter o nitrogênio atmosférico a amônio, *H. seropedicae* é capaz de produzir promotores do crescimento vegetal como o ácido indolacético, giberilinas e citoquininas (REIS *et al.*, 2000).

A inoculação de arroz com *H. seropedicae* leva a um aumento do peso úmido e seco das plantas (BALDANI *et al.*, 1996). Outros estudos mostraram que a estirpe de *H. seropedicae* (LR15) inoculada em arroz foi capaz de colonizar a superfície das raízes e os tecidos internos, e resultou em aumento da biomassa radicular (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003).

A história de alguns cultivares de cana-de-açúcar no Brasil revela que existem áreas em que esta atividade tem sido realizada por mais de cem anos sem adubação nitrogenada. Sendo assim, uma contribuição potencial para o metabolismo nitrogenado da planta é a fixação biológica de nitrogênio por meio da associação com endófitos do gênero *Herbaspirillum* spp e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (DOBEREINER, 1992). Estes resultados indicam que o *Herbaspirillum seropedicae* tem grande potencial como biofertilizante.

2.4 A PROTEÍNA NifA E O MECANISMO DE REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM *Herbaspirillum seropedicae*

Em *H. seropedicae*, o mecanismo de regulação da FBN, envolve a proteína ativadora transcricional NifA e o sistema de regulação geral de nitrogênio Ntr (SOUZA *et al.*, 1999). Na região promotora do gene *nifA* de *H. seropedicae* foram encontrados sítios para ligação da própria proteína NifA e NtrC (Souza *et al.*, 2000). Foram identificados ainda uma seqüência homóloga à seqüência consenso “anaerobox” localizada após o início de tradução, e um

sítio de ligação para a proteína IHF, localizado a jusante do sítio de ligação para a proteína NtrC (Souza *et al*, 2000).

A expressão do promotor *nifA* em *H.seropedicae*, assim como em *Klebsiella pneumoniae*, é dependente da proteína NtrC e RpoN (σ^N) (WASSEM *et al.*,2000). Através de experimentos *in vitro* WASSEN e colaboradores (2000) demonstraram que a ativação do promotor *nifA* pela proteína NtrC é estimulada pelo fator de integração do hospedeiro (IHF). Por outro lado, este mesmo fator prejudicou a ativação do promotor *nifA* pela proteína NifA, indicando que, na ativação deste promotor, o IHF atua positivamente na ativação dependente de NtrC e negativamente na ativação por NifA (WASSEM *et al.*, 2002). Adicionalmente, o promotor do gene *nifA* é reprimido por nitrogênio fixado, mas não por oxigênio (SOUZA *et al.*, 2000).

A proteína NifA pode ser dividida em três domínios (Figura 1) estruturalmente e funcionalmente distintos (MORRET e SEGOVIA, 1993).

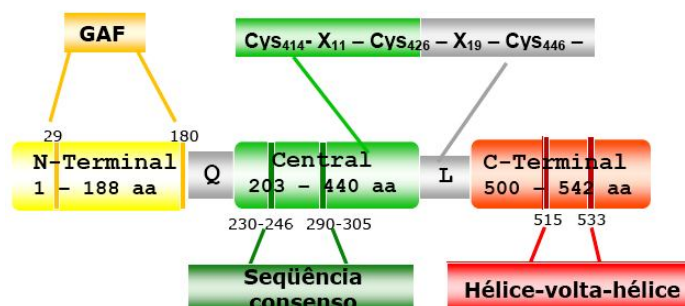


Figura 1 - Modelo esquemático dos domínios modulares da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae* (Monteiro 2001 modificado por Etto 2006).

Os domínios centrais, típicos dos membros da família AAA+, ligam ATP e são flanqueados pelo C-terminal que contém um motivo hélice-volta-hélice, e pelo N-terminal, com função regulatória (DIXON e KAHN, 2004). O domínio N-terminal é o menos conservado de todos, com um baixo grau de identidade (FISCHER, 1994). Esse domínio não é essencial para a atividade da proteína, tendo em vista que proteínas NifA com o domínio N-terminal deletado apresentam atividade (MONTEIRO *et al*, 1999a). Em *H. seropedicae* esse domínio parece estar envolvido no controle da atividade da proteína NifA por íons amônio, uma vez que quando deletado a NifA de *H.seropedicae* para de ser inibido por amônia (SOUZA *et al*, 1999; MONTEIRO *et al*, 1999a). Os

domínios N-terminal e central são separados por uma pequena região interdomínios, rica em resíduos de glutamina, e por isso conhecida como Q-linker (WOOTTON e DRUMMOND, 1989). Essa região parece não ser importante para a atividade da proteína NifA, tendo como única função fazer a junção dos dois domínios (WOOTTON e DRUMMOND, 1989; FISCHER *et al*, 1988).

O domínio central é bastante conservado e possui em torno de 240 aminoácidos (FISCHER *et al*, 1988). Esse domínio interage com σ^{54} e hidrolisa ATP para que possa ocorrer a formação do complexo aberto, sendo, portanto, o domínio da proteína NifA com atividade catalítica (DRUMMOND *et al*, 1986; MORRET e SEGOVIA, 1993; BERGER *et al*, 1995). O domínio C-terminal de todas as proteínas NifA conhecidas até o momento possui um motivo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA bastante conservado (MORETT e SEGOVIA, 1993).

Em *Klebsiella pneumoniae* e *Azotobacter vinelandii* o domínio C-terminal e o domínio central são ligados diretamente, sem uma região interdomínios, enquanto que nas outras bactérias esses domínios são ligados por um segmento contendo 30 a 50 resíduos de aminoácidos (FISCHER, 1994). Nas bactérias presentes nos subgrupos α e β das proteobactérias, nos quais essa região está presente, o segmento interdomínios é caracterizado por um motivo de quatro cisteínas (Cys-X11-Cys-X19-Cys-X4-Cys) (FISCHER *et al*, 1988). A ausência desse motivo na proteína NifA de *Bradyrhizobium japonicum* levou a uma proteína inativa, mostrando que esse motivo parece ser essencial para a atividade da proteína (FISCHER *et al*, 1988). Fischer e colaboradores também mostraram que o espaçamento entre essas cisteínas parece ser importante para a atividade da proteína NifA (FISCHER *et al*, 1989). Acredita-se que esse motivo ligue íons metálicos e, com isso, seja capaz de sensoriar o nível redox da célula, constituindo-se em um sensor de oxigênio da proteína, mas o exato papel dele ainda não foi elucidado (FISCHER *et al*, 1988; SOUZA *et al*, 1999, MONTEIRO *et al*., 2001).

A partir de evidências da participação da proteína FNR no metabolismo do nitrogênio em *Klebsiella pneumoniae* (GRABBE, KLOPPROGGE E SCHMITZ, 2001), em 2003 Monteiro e colaboradores obtiveram resultados que indicaram que a sensibilidade da NifA N-truncada de *Herbaspirillum seropedicae* ao

oxigênio, está relacionada com a proteína FNR de *Escherichia coli*. Na estirpe de *E.coli* mutante para o gene *fnr*, a proteína NifA N-truncada de *H.seropedicae* falhou na ativação do promotor *nifH* de *H. seropedicae*, tanto na presença, quanto na ausência de oxigênio. Porém quando o gene *fnr* foi expresso do seu próprio promotor, a partir de um plasmídeo transformado na estirpe de *E. coli* *fnr* mutante, o comportamento selvagem (expressão do promotor *nifH*) foi restaurado. Também foi observado que houve 95% de decréscimo na quantidade de NifA N-truncada na estirpe de *E.coli* mutante, em comparação com a estirpe selvagem. Este decréscimo teria sido gerado devido a degradação, provavelmente, por meio de uma via proteolítica (MONTEIRO *et al*, 2003).

Durante o projeto de sequenciamento do genoma da bactéria endofítica fixadora de nitrogênio *Herbaspirillum seropedicae*, Projeto GENOPAR (<<http://www.genopar.org>>), foram identificadas três proteínas análogas a FNR, do inglês, “fumarate and nitrate reductase”, uma proteína pertencente à família Crp-Fnr dos reguladores transcricionais. Em 2003, Raeder sugeriu que mutantes cromossômicos de *H. seropedicae* nos genes *fnr1* e *fnr2* tinham atividade de nitrogenase diminuída, propondo o envolvimento destes genes na fixação biológica de nitrogênio em *H.seropedicae*.

2.5 A PROTEÍNA FNR E A FAMÍLIA Crp-Fnr DOS REGULADORES TRANSCRICIONAIS

A proteína FNR pertence à família Crp-Fnr dos reguladores transcricionais. O número de integrantes desta família de proteínas têm crescido rapidamente como resultado do grande número de genomas bacterianos que vêm sendo seqüenciados. Desta maneira, a família Crp-Fnr vem obtendo o status de um dos maiores grupos de reguladores transcricionais, assim como as famílias LysR, AraC e LacI (KÖRNER, SOFIA e ZUMFT, 2003).

A proteína FNR é um regulador global do metabolismo anaeróbico em *Escherichia coli*, controlando a transcrição de mais de 125 genes (SAWERS, ZEHELEIN e BÖCK,1988). Dados mais recentes obtidos através de uma abordagem de análise de expressão genômica extensa, usando-se

microarranjos de DNA em *Escherichia coli* K12, revelaram que cerca de 297 unidades transcricionais são reguladas por FNR. Muitos destas unidades transcricionais constituem 184 operons. Se todos os genes localizados em operons fossem considerados individualmente, o número de genes regulados por FNR e ou O₂ aumentaria para cerca de 465 (KANG *et al.*, 2005).

O gene *fnr* foi primeiramente isolado por John Guest e colaboradores, em meados da década de 70, em um trabalho pioneiro de caracterização de mutantes que não eram capazes de reduzir fumarato e nitrato (LAMBDEM e GUEST, 1976).

Em *E. coli* a proteína FNR age como um regulador transcricional que responde ao estado redox intracelular, ativando genes cujos produtos estão envolvidos na respiração anaeróbica, ou reprimindo outros genes requeridos para a respiração aeróbica (UNDEN *et al*, 1995, BAUER *et al*, 1999).

Devido a uma grande similaridade de seqüência, a estrutura da proteína FNR de *E.coli*, pode ser modelada sobre a da proteína CRP, do inglês, “cyclic AMP receptor protein”, também conhecida como CAP, do inglês “catabolite activator protein”, revelando uma grande semelhança entre essas duas proteínas (SCHULTZ, SHIELDS e STEITZ, 1991). Sendo assim, FNR possui um domínio sensor N-terminal e um domínio hélice-volta-hélice de ligação ao DNA, na região C-terminal (LI *et al* 1998).

Na FNR de *E.coli*, na região N-terminal, há a presença das características estruturais para a ligação de cAMP, sendo estas, uma alfa hélice e oito folhas beta. Porém os resíduos que ligam o cAMP não são conservados. Entretanto a estrutura de folhas beta da proteína FNR é importante para a atividade, tendo em vista que este domínio contém a Cys122, que participa da formação de um grupamento Fe-S, o qual terá sua função discutida mais adiante, (KILEY e REZNIKOJ, 1991).

O domínio C-terminal possui o motivo de ligação sítio específica ao DNA, que liga-se a uma seqüência simétrica (TTGAT X₄ ATCAA) muito similar a da proteína CAP (WEBER e STEITZ, 1987).

Apesar da grande semelhança entre as proteínas CAP e FNR, existem diferenças na maneira como essas proteínas ligam-se ao DNA alvo. Na proteína CAP, a ligação do cAMP, causa uma mudança conformacional que aumenta a especificidade de ligação ao DNA alvo (KOLB, 1993). Já na proteína

FNR, a redução do grupamento Fe-S aumenta a habilidade de dimerização da proteína, aumentando também a afinidade de ligação sítio-específica ao DNA alvo (LAZAZZERA *et al.*, 1996; GREEN *et al.*, 1996; KHOROSHILOVA *et al.*, 1995, 1997).

Em *E. coli*, a proteína FNR contém na região N-terminal 4 resíduos de cisteína (Cys20, Cys23, Cys29 e Cys122) que são importantes para a percepção dos níveis de oxigênio (SHARROCKS, GREEN e GUEST, 1990 ; SPIRO e GUEST, 1988).

Em 1996, Lazazzera e colaboradores descrevendo uma purificação anaeróbica da proteína FNR de *E. coli* observaram que esta continha um grupamento [4Fe-4S]. Em contraste com a purificação feita em condições aeróbicas, essa preparação continha grandes quantidades de dímeros em solução. Esta preparação, também demonstrou capacidade de ligação sítio específica ao DNA.

Removendo-se o grupamento Fe-S com um quelante de ferro, Lazazzera e colaboradores (1996) demonstraram que o grupamento [4Fe-4S] é essencial para aumentar a dimerização e conseqüentemente a ligação sítio específica ao DNA, como observado na purificação anaeróbica (LAZAZZERA *et al.* 1996). A proposta de que a dimerização era suficiente para aumentar a afinidade de ligação sítio-específica da proteína FNR ao DNA, foi confirmada através de análise de mutantes com substituições do resíduo de aminoácido Asp154 (localizado na hélice de dimerização). Esta substituição, aumenta a capacidade de dimerização da apoFNR (FNR sem Fe e S²⁻) e ainda permite que a FNR tenha atividade na presença de oxigênio (LAZAZZERA, BATES e KILEY, 1993; BATES, LAZAZZERA e KILEY, 1995).

O grupamento [4Fe-4S]²⁺ é essencial para a sensibilidade ao O₂. Quando exposto a oxigênio, este grupamento é convertido a sua forma oxidada [2Fe-2S]²⁺ (KILEY e BEINERT, 1999; KHOROSHILOVA *et al.*, 1995, 1997; GREEN *et al.*, 1996). Esta forma da proteína FNR não é ativa, sendo assim não atua na regulação transcricional. Depois de uma prolongada exposição ao O₂, o grupamento [2Fe-2S] se desintegra e é formado uma apoFnr, isenta de Fe e sulfidro (LAZAZZERA *et al.*, 1996).

Experimentos envolvendo a investigação do processo de ativação da proteína FNR *in vivo*, sugeriram que este processo de conversão entre as

forma ativa e inativa da FNR é reversível. Esta conclusão baseou-se na observação de que não há necessidade de uma nova síntese de proteína para ativação da FNR *in vivo*, quando culturas em condições de crescimento aeróbicas foram transferidas para condições anaeróbicas de cultivo (ENGEL, TRAGESSER e UNDEN, 1991). Porém ainda não se sabe qual forma da proteína FNR (2Fe-2S ou a apoFNR-sem Fe e S²⁻) é ativada nessas condições de mudança do metabolismo aeróbico para o anaeróbico (ENGEL, TRAGESSER e UNDEN, 1991).

Em *E.coli* a expressão de FNR é dependente de σ^{70} (SHAW e GUEST, 1982). Em 2007, Mettert e Kiley sugeriram a presença de um elemento de ligação da IHF (*integration host factor*) que aumenta a expressão de *fnr* em *E.coli* (Figura 2).

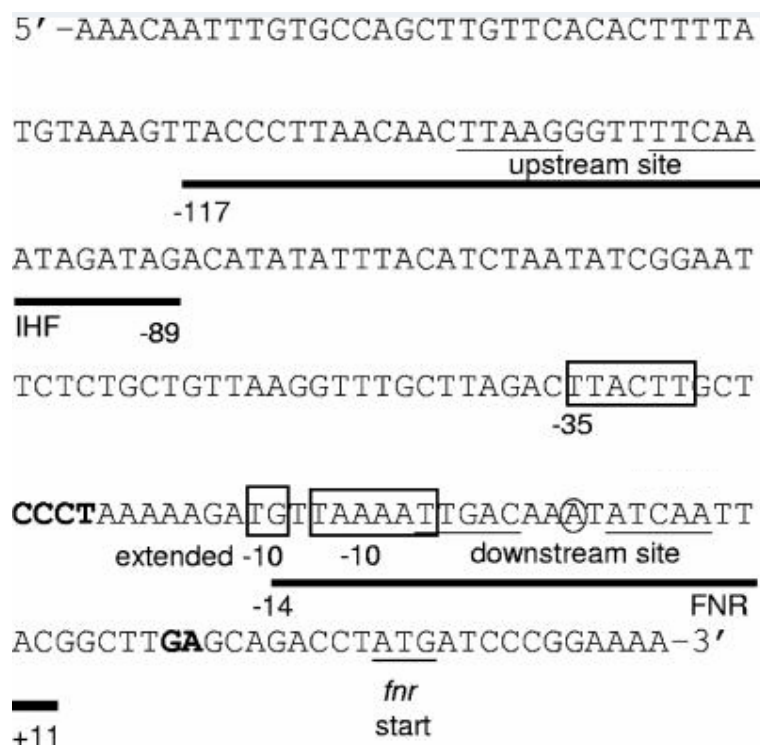


Figura 2 – Região promotora do gene *fnr* de *Escherichia coli*. Os nucleotídeos -163 a +40 estão sendo demonstrados em relação ao sítio de começo da transcrição (circulado). Os sítios preditos de ligação para FNR localizados *downstream* e *upstream* do promotor estão grifados. O códon de início do gene *fnr* também está grifado e as regiões -35 e -10 do promotor estão em uma caixa. Grifado em negrito estão os sítios de proteção por IHF (-117_ - 89) ou FNR (-14_+11) da clivagem por DNaseI. Adaptado de Mettert e Kiley, 2007.

Na figura 2, o sítio predito para ligação da proteína FNR, localizado na região *upstream* do promotor, parece não ser um sítio de ligação a FNR, de acordo com dados de *footprinting* de DNA (METTERT e KILEY, 2007). Os mesmos autores encontraram nesta região, uma sequência de ligação de IHF que aumenta a expressão do gene *fnr* de *E.coli* tanto em condições aeróbias quanto em condições anaeróbias (METTERT e KILEY, 2007). Estes resultados estão de acordo com estudos prévios que indicaram que seqüências de DNA localizadas a montante da região -41, em relação ao sítio de início da transcrição, eram importantes para a expressão máxima do gene *fnr* em *E.coli* (SAWERS, 2005). Somente IHF não altera a transcrição de *fnr in vitro*, sugerindo que nestas condições, o papel de IHF na ativação do promotor *fnr*, ou de um outro fator transcricional juntamente com IHF, tenha sido suprimido. Alternativamente IHF pode ativar a transcrição do promotor *fnr*, impedindo a repressão do mesmo por outros fatores de transcrição (METTERT e KILEY, 2007). Esse parece ser o caso do promotor *nir*, no qual a ligação de IHF, no sítio de ligação II, diminui a repressão do promotor *nir*, mediada pela ligação de IHF e FIS em outros sítios (BROWNING, *et al* 2002).

Um esquema para a regulação da repressão do promotor *fnr* está representado na figura 3.



Figura 3 – Prováveis regiões de ligação de proteínas que participam da regulação negativa da expressão do promotor *fnr* de *Escherichia coli*. Adaptado do site <<http://ecocyc.org/>>, acesso em 10/12/2008.

A sequência de ligação para ArcA na região promotora não é conhecida, mas sugere-se que ela deve ligar-se a tal sítio devido ao fato de mutantes AraC- de *E.coli*, sob condições microaeróbicas, terem a expressão de *fnr* aumentada aproximadamente duas vezes (SHALEL-LEVANON, *et al* 2005). Em contrapartida, os estudos realizados por Mettert e Kiley em 2007, indicaram que não há a participação de ArcA na repressão do promotor *fnr*.

A repressão do promotor *fnr* de *E. coli* parece ocorrer apenas devido a ligação da proteína FNR ao sítio localizado na região *downstream* do promotor, porém o mecanismo pelo qual FNR previne a transcrição pela RNA polimerase não é conhecido. Considerando-se a posição do sítio *downstream* para ligação da proteína FNR, a -0,5pb do início da transcrição, pode-se sugerir que FNR bloqueie a ligação da RNA polimerase ao promotor por meio de impedimento estérico (METTERT e KILEY, 2007).

2.6 O PAPEL DA PROTEÍNA FNR NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM *Klebsiella pneumoniae*

Em *Klebsiella pneumoniae*, a proteína FNR é requerida na via que evita a inibição da NifA pela NifL em condição de anaerobiose. Na falta da proteína FNR, a NifL, não recebe o sinal de anaerobiose, sendo assim, a NifL continua inibindo a NifA, mesmo em condições de limitação de oxigênio (GRABBE, KLOPPROGGE, SCHMITZ, 2001).

Em *K. pneumoniae* e *Azotobacter vinelandii*, a atividade da NifA é regulada por uma segunda proteína regulatória, a NifL. Nestes dois organismos, a NifL é uma flavoproteína com um FAD (do inglês, “flavin adenine dinucleotide”) ligado na região N-terminal como um grupo prostético (HILL *et al*, 1996; KLOPPROGGE e SCHMITZ, 1999). A proteína NifL é um regulador negativo dos genes *nif*, que inibe a ativação transcricional por meio da NifA em resposta a nitrogênio e/ou oxigênio. A inibição da atividade na NifA, por meio da NifL, ocorre por meio de uma interação direta proteína-proteína. (GOVANTES, ANDUJAR e SANTERO, 1998; HENDERSON, AUSTIN e DIXON, 1989; LEI, PULAKAT, GAVINI, 1999 ; MONEY *et al*, 1999).

A proteína NifL de *K. pneumoniae* sob altos níveis de oxigênio, encontra-se no citoplasma e está com seu co-fator FAD oxidado em uma conformação inibitória. Já em baixos níveis de oxigênio, encontra-se associada a uma oxiredutase na membrana citoplasmática. Esta oxiredutase liga a NifL e reduz o co-fator FAD a FADH₂, gerando uma alteração conformacional que diminui a afinidade de ligação a NifA (KLOPPROGGE *et al*, 2002; GRABBE e SCHMITZ , 2003).

Para verificar a hipótese de que a NifL era reduzida por uma oxiredutase de membrana, Grabbe e Schmitz estudaram possíveis doadores de elétrons localizados na membrana plasmática. Eles analisaram o efeito de diferentes sistemas oxiredutores sob a indução dos genes *nif* de *K. pneumoniae* e observaram uma diminuição da atividade da NifA na ausência da NADH ubiquinona redutase e de uma formato desidrogenaseN funcionais (GRABBE e SCHMITZ , 2003).

Baseado em análises preliminares das seqüências localizadas a montante do gene *nuoA* de *K. pneumoniae* e da taxa de oxidação do NADH na estirpe de *K. pneumoniae* mutante no gene *fnr*, Grabbe e Schmitz (2003) propuseram que as oxiredutases de membrana da cadeia transportadora anaeróbica, que são possíveis doadores de elétrons, são reguladas ao nível transcricional pela proteína FNR, sob condições anaeróbicas.

A partir dessas observações Grabbe e Schmitz (2003) propuseram que sob condições anaeróbicas, FNR é um sensor primário de O₂, que ativa a expressão dos genes que codificam para as proteínas NADH ubiquinona redutase e a formato desidrogenaseN. Estas oxiredutases de membrana geram um *pool* de quinonas reduzidas na membrana citoplasmática, que permite a transferência de elétrons para o co-fator FAD da proteína NifL, reduzindo-a. Sendo assim, a NifL em sua forma reduzida, sofre alterações conformacionais que livram a NifA da inibição por NifL (GRABBE e SCHMITZ , 2003).

Recentemente sugeriu-se que, assim como em *K. pneumoniae*, a proteína FNR pode ser um sensor primário de O₂ importante para a sinalização dos níveis de O₂ para a proteína NifA de *H. seropedicae*. (MONTEIRO *et al*, 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As estirpes de *Escherichia coli* utilizadas estão listadas na tabela 1.

Tabela 1 - Estirpes de *Escherichia coli* utilizadas

Estirpe	Característica	Referência
TOP 10	<i>hscR</i> , <i>mcrA</i> , <i>lacZΔM15</i> , <i>recA</i>	INVITROGEN
S17.1	Sm ^R , Tra ⁺	SIMON, PRIEFFER e PUHLER, 1983

As estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* utilizadas estão listadas na tabela 2.

Tabela 2 – Estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* utilizadas

Estirpe	Característica	Referência
SmR1	Estirpe selvagem, Sm ^R , Nif+	SOUZA <i>et al.</i> , 2000
MBHS2-1A	SmR1 mutante cromossomal no gene <i>fnr2</i> , Km ^R	Este trabalho
MBHS2-2A	SmR1 mutante cromossomal no gene <i>fnr2</i> , Km ^R	Este trabalho
MBHS2-3A	SmR1 mutante cromossomal no gene <i>fnr2</i> , Km ^R	Este trabalho
MBHS2-3C	SmR1 mutante cromossomal no gene <i>fnr2</i> , Km ^R	Este trabalho
MBHS2-4A	SmR1 mutante cromossomal no gene <i>fnr2</i> , Km ^R	Este trabalho

Os plasmídeos utilizados estão listados na tabela 3.

Tabela 3 – Plasmídeos utilizados

Plasmídeo	Característica	Referência
pSUP202	Cb ^R , Cm ^R , Tc ^R , Mob	SIMON, PRIEFFER e PUHLER, 1983
pGEM-T easy	Amp ^R , 3'-T p/ ligação de amplificadores pela <i>Taq</i>	PROMEGA
pCR2.1	Cm ^R , Km ^R , 3'-T p/ ligação de amplificadores pela <i>Taq</i>	INVITROGEN
pUC4K	Amp ^R , Km ^R	TAYLOR, L.A. e ROSE, R.E, 1988
pMBB1	Região codificadora do gene <i>fnr1</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado no vetor pGEMT-easy	Este trabalho
pMBB2	Região codificadora do gene <i>fnr2</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado no vetor pGEMT-easy	Este trabalho
pMBB3	Região codificadora do gene <i>fnr3</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado no vetor pGEMT-easy	Este trabalho
pMBB4	Região codificadora do gene <i>fnr1</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado no vetor pCR2.1	Este trabalho
pMBB5	Região codificadora do gene <i>fnr2</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado no vetor pCR2.1	Este trabalho
pMBB6	Região codificadora do gene <i>fnr3</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado no vetor pCR2.1	Este trabalho
pSU P _{fnr1}	Fragmento Sph I/Sal I do vetor pMBB1 clonado no pSUP202	Este trabalho
pSUP _{fnr2}	Fragmento Sph I/Sal I do vetor pMBB2 clonado no pSUP202	Este trabalho
pSUP _{fnr3}	Fragmento Sph I/Sal I do vetor pMBB3 clonado no pSUP202	Este trabalho
pSUP _{fnr1} Km	pSUP _{fnr1} contendo um cassete Km ^R no sítio PstI do gene <i>fnr1</i>	Este trabalho
pSUP _{fnr2} Km	pSUP _{fnr2} contendo um cassete Km ^R no sítio Bgl II do gene <i>fnr2</i>	Este trabalho

3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio líquido NFb-malato (PEDROSA e YATES, 1984) a 30°C, sob agitação de 120 rpm. Já as culturas em meio sólido ou semi-sólido foram crescidas em NFb-malato sem agitação e incubadas em estufa a 30°C.

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) (SAMBROOK et al., 1989) sob agitação de 150 rpm ou em meio sólido LA, a 37°C. Para o preparo de células eletrocompetentes de *E. coli*, a estirpe Top10 foi cultivada em meio SOB a 37°C sob agitação de 150 rpm. Após a eletroporação, as células de *E. coli* foram recuperadas em meio SOC a 37°C, sob agitação.

O meio NFb-malato (PEDROSA e YATES, 1984) tem a composição apresentada na tabela 4.

Tabela 4 – Composição do meio NFb-malato

Elemento	gramas/litro
MgSO ₄ . 7H ₂ O	2,0 . 10 ⁻¹
NaCl	1,0 . 10 ⁻¹
CaCl ₂	2,0 . 10 ⁻²
Ácido nitrilo-triacético	5,6 . 10 ⁻²
FeSO ₄ . 7H ₂ O	2,0 . 10 ⁻²
Ácido málico	5,0
Biotina	1,0 . 10 ⁻⁴
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	2,0 . 10 ⁻³
MnSO ₄ . H ₂ O	2,35 . 10 ⁻³
H ₃ BO ₃	2,8 . 10 ⁻³
CuSO ₄ . 5H ₂ O	8,0 . 10 ⁻⁵
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2,4 . 10 ⁻⁴

No momento do uso foram adicionados ao meio NFb-malato 50 mL/L ou 10mL/L de solução esterilizada de fosfatos (159,4 g/L de KH_2PO_4 e 17,8 g/L de K_2HPO_4). Estes meios foram denominados respectivamente de NFbHP-malato e NFbLP-malato. Como fonte de nitrogênio foi utilizado NH_4Cl 20 mmol/L. As soluções de fosfatos e cloreto de amônio foram autoclavadas separadamente e adicionadas ao meio no momento do uso. O meio NFbHP-malato com adição de 20 mmol/L e de NH_4Cl foi denominado NFbHPN-malato. Os meios sólido e semi-sólido foram obtidos adicionando-se ágar nas concentrações de 15 g/L e 1,5 g/L, ao meio líquido, respectivamente.

O meio LB (Luria Bertani) (SAMBROOK et al., 1989) tem a composição listada na tabela 5.

Tabela 5 – Composição do meio LB (Luria Bertani)

Elemento	gramas/litro
Extrato de levedura	5
Cloreto de sódio	10
Triptona	10

Adicionando-se ágar na concentração de 15 g/L ao meio líquido, obteve-se o meio sólido, denominado meio LA.

O meio SOB (SAMBROOK et al., 1989) tem a composição apresentada na tabela 6.

Tabela 6 – Composição do meio SOB

Elemento	gramas/litro
Bacto triptona	20
Extrato de levedura	5
Cloreto de sódio	0,5
Cloreto de potássio	0,186
Sulfato de magnésio	2,4

Com a adição de glucose 20 mmol/L ao meio SOB, obteve-se o meio SOC. Os antibióticos e concentrações utilizadas estão listados abaixo na tabela 7.

Tabela 7 – Relação dos antibióticos utilizados para seleção

Antibiótico	Abrv.	Concentrações utilizadas
Ampicilina	Amp	250 µg/mL ¹
Ácido Nalidíxico	Nar	5 µg/mL ¹
Canamicina	Km	100 µg/mL ¹ 500 µg/mL ² 1000 µg/mL ²
Cloranfenicol	Cm	30 µg/mL ^{1,2}
Estreptomicina	Sm	80 µg/mL ^{1,2}
Tetraciclina	Tc	10 µg/mL ^{1,2}

¹ *Escherichia coli*

² *Herbaspirillum seropedicae*

As estirpes de *E. coli* foram mantidas em estoque em solução de glicerol 50% a -20°C. As estirpes de *H. seropedicae* foram estocadas a temperatura ambiente em meio NFbHPN-malato semi-sólido.

3.3 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS EM PEQUENA ESCALA

A purificação de plasmídeos foi feita segundo o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). Um mililitro e meio de cultura bacteriana, contendo o plasmídeo de interesse, foi centrifugado a 13.000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. O sedimento de células foi ressuspensão em 150µL de GET (glucose 50 mmol/L, Tris.HCl 25 mmol/L pH 8.0 e EDTA 10 mmol/L), e então lisado pela adição de 150µL de Solução de Lise (SDS 1% e NaOH 0,18 mol/L) e suave homogeneização. Em seguida, a adição de 150µL de Kcaf (acetato de potássio 3mol/L pH 4,8 e ácido fórmico 1,8mol/L) e incubação por 15 minutos no gelo, precipitou o DNA cromossomal, proteínas e fragmentos celulares. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado e tratado com 100µl da mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). O DNA plasmidial foi precipitado

com a adição de 3 volumes de etanol 96% ou de 0,6 volume de isopropanol, a mistura foi homogeneizada vigorosamente e então centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi lavado com 1mL de etanol 70%, seco a vácuo ou a temperatura ambiente, dissolvido em 30 µL de água ultrapura e o rendimento da purificação foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose.

3.4 ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE

A eletroforese de DNA foi feita em gel de agarose horizontal como descrito por SAMBROOK *et al* (1989). O tampão utilizado foi TBE 1X (Tris-borato 40 mmol/L e EDTA 1mmol/L pH 8,3). As amostras de DNA foram misturadas a 5µl de Fsuds (azul de bromofenol 0.8%, ficol 10%, xileno cianol 0.4%, SDS 1%, EDTA 1,8mmol/L, pH 8,0) para posterior aplicação nos poços do gel. Após a corrida eletroforética a 50-75V, o gel foi transferido para um recipiente contendo solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL). O gel foi incubado nesta solução por cerca de 20 minutos, transferido para um recipiente contendo água, onde foi brevemente lavado. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta (312 nm) em transiluminador EC3 System – UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CAUSA). O registro das imagens foi feito em papel térmico Sony (Video printer GraficUP860CE).

3.5 CLIVAGEM DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

A digestão de DNA com enzimas de restrição foi feita seguindo as recomendações especificadas nos catálogos dos fabricantes INVITROGEN ou FERMENTAS.

3.6 PREPARO DOS VETORES DE CLONAGEM

Os vetores foram clivados com as enzimas de restrição adequadas. Após a restrição, as enzimas foram desnaturadas por extração com um volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). O vetor foi precipitado com etanol absoluto,

lavado com etanol 70%, seco a vácuo ou a temperatura ambiente e dissolvido em água ultrapura estéril (SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.7 LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA A VETORES

O vetor linearizado foi ligado ao inserto numa razão molar de aproximadamente 1:3. Para a ligação foram adicionados tampão de ligação e 0,5U de T4 DNA ligase e o sistema foi incubado a aproximadamente 20°C durante a noite.

3.8 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

Para o preparo de células de *E. coli* eletrocompetentes uma cultura saturada de *E. coli* foi inoculada em meio SOB na proporção de 1:100. A cultura foi cultivada até D.O.₆₀₀ de $\approx 0,5 - 0,8$ nas condições descritas no item 3.2. As células foram coletadas por centrifugação (2.500 x g por 5 minutos, a 4°C) e lavadas duas vezes com água estéril gelada. Em seguida, foram ressuspensas em glicerol 15% gelado, centrifugadas novamente 2.500 x g por 5 minutos, sob refrigeração, ressuspensas em um volume final de aproximadamente 1 mL de glicerol 15% gelado, aliqüotadas em microtubos em um volume de 100 μ L e armazenadas a -70°C. As células foram mantidas a baixa temperatura durante todo o procedimento (baseado em DOWER *et al.*, 1988; HANAHAN, 1983).

Para o preparo de células de *H. seropedicae* eletrocompetentes 100 μ L de uma cultura de *H. seropedicae* D.O.₆₀₀ $\approx 2,0$ foram inoculados em 100 mL de meio NFbHPN-malato. A cultura foi cultivada até D.O.₆₀₀ de 0,8-1,0. As células foram coletadas por centrifugação (2.500 x g por 5 minutos) e lavadas uma vez com água estéril gelada. Em seguida, foram ressuspensas em glicerol 15% gelado, centrifugadas novamente (2.500 x g por 5 minutos), ressuspensas em um volume final de aproximadamente 1mL de glicerol 15% gelado, alíquotadas em microtubos (100 μ L) e armazenadas a -70°C.

A transformação por eletroporação foi feita utilizando o aparelho BioRad Gene Pulser II. As cubetas de eletroporação (BioRad Laboratories) foram colocadas previamente em gelo. As células eletrocompetentes foram

descongeladas em banho de gelo e então de 1-4µL de DNA foram adicionados e misturados a suspensão de células eletrocompetentes.

Finalmente as células eletrocompetentes juntamente com o DNA, foram transferidas para a cubeta de eletroporação. As condições de eletroporação foram 100Ω, 1.8kV e 25µF (SHENG, MANCINO e BIRREN, 1995). Depois da eletroporação de *E.coli*, 900 µL de meio SOC foi imediatamente adicionado a cubeta de eletroporação, e logo depois esse conteúdo foi transferido para um vidro de cultura estéril e incubado sob agitação a 37°C para recuperação. Já para as células de *H. seropedicae*, a recuperação foi feita com adição de 0,9 mL de meio NFbHPN-malato acrescido de 20 mmol/L de NH₄Cl às cubetas de eletroporação e transferência para vidros de cultura estéreis e incubação a 30°C, sem agitação, por 3 - 4 horas. A suspensão de bactérias de *E.coli* foi plaqueada em meio sólido LA, já a de *H. seropedicae* foi plaqueada em meio sólido NFbHPN-malato, ambos na presença dos antibióticos adequados para seleção (Item 3.2).

3.9 TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS POR CONJUGAÇÃO

Os plasmídeos recombinantes a serem transferidos para a estirpe SmR1 de *H. seropedicae* foram primeiramente transformados em *E. coli* S17.1 (*tra*⁺). As estirpes de *H. seropedicae* (receptora) e *E. coli* (doadora) foram cultivadas nos meios NFbHPN-malato e LB, respectivamente, sem antibióticos. Em seguida, foram feitas misturas da cultura de *H. seropedicae* com cultura de *E. coli* em duas proporções distintas.

Em um microtubo foram misturados 50 µL da cultura de *H. seropedicae* com 5 µL da cultura de *E. coli*, e em outro misturou-se 100 µL da cultura de *H. seropedicae* com 2 µL da cultura de *E. coli*. As suspensões de células de ambas misturas foram colocadas em pólos distintos na placa, como uma gota em meio LA/NFbHPN-malato (1:3) e incubadas a 30 °C por 24 horas. A massa de células foi raspada, suspensa em 1 mL de NFb-malato e então 200µL foram plaqueados em meio NFbLP-malato sólido acrescido de 20 mmol/L de NH₄Cl e contendo os antibióticos adequados.

3.10 SEQUENCIAMENTO DE DNA

O DNA dupla fita para sequenciamento foi obtido basicamente como descrito no Item 3.3. A reação de sequenciamento foi feita utilizando dideoxynucleotídeos terminadores de cadeia marcados com fluoróforos (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977). Nesta reação foram utilizados aproximadamente 0,5 µg do DNA purificado (Item 3.3), 2 pmols do *primer* apropriado e 3,0 µL de mistura para sequenciamento Sequencing Reagent Premix (DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences). O volume final da reação foi de 7,5 µL. A reação foi feita utilizando termociclador da Eppendorf e os parâmetros utilizados foram: 1 ciclo de 1 minuto a 95°C e 35 ciclos de 20 segundos a 94 °C e 1,5 minutos a 60°C. O produto da reação de amplificação, acrescido de 10µL de água ultrapura, foi precipitado com 2µL de Acetato de Amônio 7,5mol/L e 60µL de etanol absoluto e submetido a centrifugação na temperatura ambiente a 13.000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a vácuo por uma hora e meia e então dissolvido em 4 µL de Formamide Loading Dye (Applied Biosystems), desnaturado por 2 minutos a 96°C e submetido à eletroforese em um seqüenciador automático de DNA da ABI-PRISM 377 (Applied Biosystems). As seqüências obtidas no formato FASTA foram submetidos a análise no banco de dados do GENOPAR (<<http://www.genopar.org>>) e também do NCBI (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>).

3.11 AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA POR PCR

A amplificação dos genes *fnr1*, *fnr2* e *fnr3* de *H. seropedicae* foi feita pelo método de reação em cadeia da polimerase. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram sintetizados quimicamente e estão listados na tabela 8.

Tabela 8 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR

Gene	Oligonucleotídeo	Sequência
<i>fnr1</i>	<i>fnr1F</i>	5'ACCAGTTGTGCCTGCCCA3'
	<i>fnr1R</i>	5'CTGCTTGCGGAAGTTGGA3'
<i>fnr2</i>	<i>fnr2F</i>	5'CAATGACCTGAGTAAGCGT3'
	<i>fnr2R</i>	5'GAACTTGCTGATGAGGCG3'
<i>fnr3</i>	<i>fnr3F</i>	5'TTCCACCCACAAGCATTC3'
	<i>fnr3R</i>	5'TGAAGTTGGTCAGCAGGC3'

Na reação de amplificação foram utilizados 10 U de Taq DNA polimerase (MGM Acessoria Biológica), tampão para a Taq na concentração de 1X no volume final de reação, 0,2 mol/L de dNTP, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,5 mmol/L de MgCl₂, aproximadamente 20ng de DNA em um volume final de reação de 50µl. Os parâmetros utilizados foram os seguintes: 1 ciclo de 45 segundos a 93°C, 30 ciclos de 45 segundos a 93°C, 45 segundos a 50°C e um 1,5 minuto a 72°C; 1 ciclo de 15 minutos a 72°C. A verificação da amplificação foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1%, como descrito no item 3.4.

3.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução do acetileno a etileno (KLASSEN *et al.*, 1997).

Os frascos com culturas em meio NFbHP-malato semi-sólido suplementado com 0,5 mmol/L de glutamato foram vedados com rolhas de borracha (suba-seal) e então foi injetado acetileno gasoso (10% do volume da fase gasosa do frasco). A cultura foi incubada a 30°C por 1 hora. Após este período, foi coletada uma amostra de 0,5 mL para análise por cromatografia gasosa do etileno formado. Foi utilizado cromatógrafo Varian Star 3400 CX equipado com uma coluna de Porapak N e detector de ionização de chama. A temperatura da coluna foi mantida em 120 °C e do detector em 200 °C. O gás de arraste foi o nitrogênio super seco. Etileno padrão (100 ppm) foi fornecido pela White Martins S.A. A atividade da nitrogenase foi expressa como nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína da cultura.

Este ensaio é um método de determinação de atividade indireto, pois avalia a quantidade de etileno formado após injeção de acetileno nos frascos de cultura de NFbHP-malato, suplementado 0,5 mmol/L de glutamato. Após a injeção de acetileno e um tempo de incubação de uma hora, 0,5 ml da fase gasosa dos frascos, foram coletados e aplicados no cromatógrafo gasoso para avaliação da quantidade de etileno formado. Depois da coleta da fase gasosa dos frascos para a cromatografia gasosa, a fase semi-sólida foi vigorosamente homogeneizada em vórtex e então congelada para a realização do ensaio de determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford (Item 3.13).

3.13 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas foi feita utilizando-se o método de Bradford (1976). Este é um método colorimétrico que se baseia na ligação do Comassie Brilliant Blue G-250 à proteína. A reação se completa em aproximadamente 2 minutos e permanece estável durante uma hora.

Para a dosagem, 50µL de cultura bacteriana, proveniente de meio semi-sólido (Item 3.2), foram primeiramente lisadas pela adição de 50 µL de NaOH 0,2mol/L e incubação por 30 a 60 minutos a temperatura ambiente. Depois deste tempo de incubação, 30 µL do produto de lise foram transferidos para poços de uma placa de ELISA onde finalmente foi adicionado um volume de 170µL de reativo de Bradford (Comassie Brilliant Blue G-250 100mg/L, etanol 95% e ácido fosfórico 85%). Após a homogeneização, a absorbância a 595nm foi determinada em um leitor de microplacas. Cada ensaio de determinação da concentração de proteínas foi realizado em duplicata e a curva padrão foi feita utilizando-se BSA (albumina de soro bovina) em diferentes concentrações (0,6µg/µL - 20 µg/µL) preparado com o mesmo tampão das proteínas a serem quantificadas. A determinação da concentração de proteínas foi utilizada para o cálculo da atividade do complexo enzimático da nitrogenase.

3.14 ANÁLISE *in silico*

As análises *in silico* foram feitas a partir das seqüências de nucleotídeos e também das seqüências primárias de aminoácidos deduzidas dos genes *fnr1*, *fnr2* e *fnr3* identificados durante o projeto de sequenciamento do genoma da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (GENOPAR <<http://www.genopar.org>>). Estas seqüências foram analisadas utilizando-se diferentes programas e bancos de dados como relatado a diante.

O acesso ao padrão de conservação da região vizinha dos genes *fnr* de *H. seropedicae* foi feita através de análises contra o banco de dados STRING 8 “Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins” (JENSEN, *et al.*, 2008). A comparação de seqüências de *H. seropedicae* com diversos rizóbios foi feita acessando o genoma destes organismos, por meio do banco de dados RhizoBase disponível em <<http://bacteria.kazusa.or.jp/rhizobase/>>. A busca de ORFs foi feita utilizando o programa Frameplot 2.3.2 disponível no endereço <<http://www.nih.go.jp/~jun/cgi-bin/frameplot.pl>> (ISHKAWA e HOTTA, 1999). O alinhamento de seqüências foi feita utilizando-se o programa ClustalW disponível no endereço <<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>>. A análise da estrutura secundária das proteínas foi feita através do programa PSIPRED “Protein Structure Prediction Server” disponível em <<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>> (MCGUFFIN e BRYSON, 2000 e JONES, 1999). Para a construção dos modelos estruturais teóricos das proteínas FNR de *H. seropedicae*, baseados em homologia, foi utilizado o programa SWISS-MODEL disponível em <<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>> (GUEx e PEITSCH 1997, SCHWEDE *et al.*, 2003, KOPP e SCHWEDE, 2004 e ARNOLD *et al.*, 2006). Estes modelos foram gerados com bases em estruturas depositadas no “Protein Data Bank (PDB)” disponível em <<http://www.rcsb.org>> (WESTBROOK *et al.*, 2003). A análise dos modelos estruturais e também a sobreposição entre eles foram feitas utilizando-se o programa “Visual Molecular Dynamics” (HUMPHREY, DALKE e SCHULTEN, 1996) e também o programa PyMol (DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, 2002, USA <<http://www.pymol.org/>>). As estruturas tridimensionais para as proteínas FNR de *H. seropedicae* foram submetidas à análise utilizando-se o programa MolProbity disponível em <<http://molprobity.biochem.duke.edu/>> (DAVIS *et al* 2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DA REGIÃO DOS GENES *fnr* DE *Herbaspirillum seropedicae* NO GENOMA

Associações conservadas de genes são características bastante úteis, que podem ser obtidas por meio de comparações genômicas dependentes de ferramentas de bioinformática, usadas contra uma grande gama de informações (KÖRNER, SOFIA e ZUMFT, 2003).

A região vizinha dos genes *fnr* de *H. seropedicae* foi analisada e comparada contra o banco de dados STRING 8 - *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* (JENSEN, *et al.*, 2008), que revela interações já conhecidas entre proteínas e também entre genes, incluindo relações físicas e funcionais, de um número total de aproximadamente 2,5 milhões de proteínas de 630 organismos diferentes. Körner, Sofia e Zumft, 2003 descreveram um padrão de vizinhança gênica analisando 4000 genes, cinco em cada direção a partir das proteínas Crp-Fnr, e definiram que proteínas de operons do tipo *ccoNOQP* (homólogo ao operon *fixNOQP* encontrado em rizóbios), que codificam oxidases do tipo *ccb3* e a proteína de biossíntese do heme HemN, estão frequentemente associadas com múltiplos reguladores da família Crp-Fnr, principalmente com as proteínas FNR de diferentes organismos.

Análises de vizinhança gênica para o gene *fnr1* (Figura 4) revelaram uma alta conservação deste padrão de vizinhança descrito por Körner, Sofia e Zumft, 2003. Além disso, é conhecido que vários rizóbios apresentam este mesmo padrão, sendo que nestes organismos, a proteína FNR é substituída por uma proteína homóloga, a FixK₂, também pertencente a família Crp-Fnr dos reguladores transcricionais.

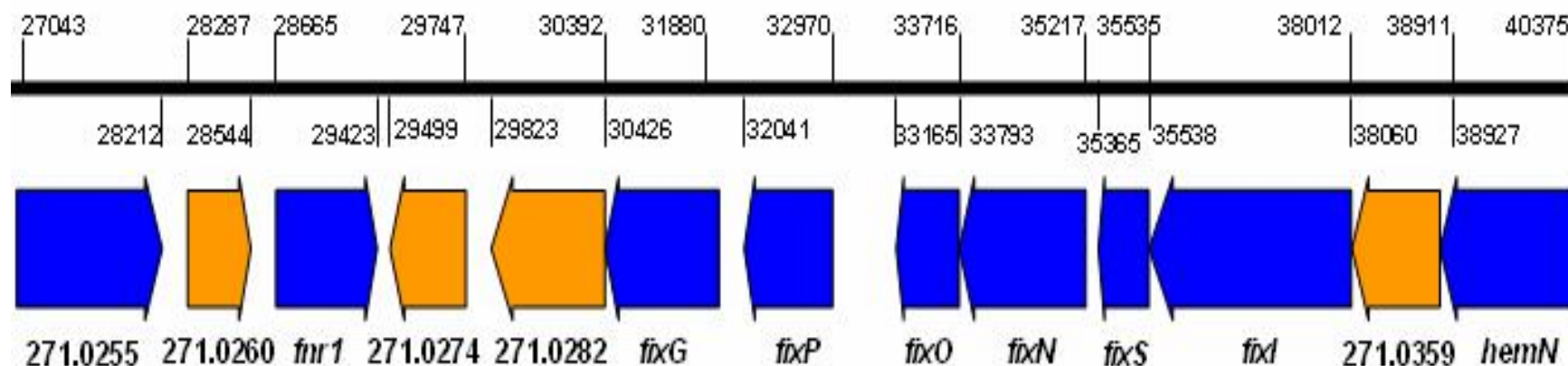


Figura 4 – Organização estrutural da região do gene *fnr1* no genoma de *Herbaspirillum seropedicae*. HS 271.0255 – provável desaturase de ácido graxo, HS 271.0260 – proteína hipotética, *fnr1* – Ativador transcricional FNR1, *fixG* – provável 4Fe-4S ferredoxina transmembrana, *fixP* – citocromo c oxidase-subunidade III, *fixO* – provável citocromo oxidase-subunidade II, *fixN* – provável citocromo oxidase-subunidade I, *fixS* – provável proteína de fixação de nitrogênio, *fixI* – provável transportadora de cátion ATPase tipo P, HS 271.0274 – provável proteína transmembrana, HS 271.0282 – (*fixH*) provável lipoproteína transmembrana, HS 271.0359 – proteína conservada hipotética, *hemN* – provável coproporfirinogeno III oxidase. A linha preta acima dos diagramas dos genes indica as distâncias em pares de base entre cada gene no genoma.

Fazendo o alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos das proteínas vizinhas a FNR1, utilizando-se o banco de dados STRING, observou-se uma conservação do padrão de vizinhança em *Bradyrhizobium sp* e também em *Sinorhizobium meliloti*. Na figura 5 está apresentado a região dos genes *fix* de *Bradyrhizobium japonicum* para comparação com a região equivalente em *H. seropedicae*.

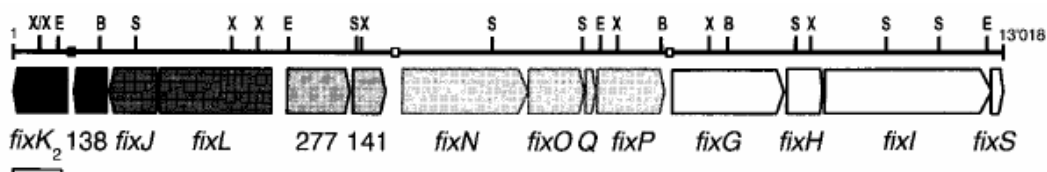


Figura 5 – Organização estrutural da região dos genes *fix* de *Bradyrhizobium japonicum*. Está destacando o sistema regulatório, dos operons *fixNOQP* e *fixGHIS*, de dois componentes oxigênio sensíveis FixL-FixJ juntamente com o FixK₂. Retirado de NELLEN-ANTHAMATTEN, *et al*, 1998).

A proteína FixK em *S. meliloti* é parte de uma cascata regulatória na qual, a hemoproteína ligada a membrana FixL, monitora baixas concentrações de oxigênio, fosforilando-se, e depois transferido o motivo de fosfato para a regulador FixJ, que finalmente ativa a expressão do gene *fixK* (BATUT e BOISTARD, 1994). A proteína FixK ativa um grande número de genes ou operons, incluindo os operons *fixNOQP* e *fixGHIS*, os quais são responsáveis pela síntese de oxidases de alta afinidade para respiração em condições microaeróbicas, como em nódulos de raízes de leguminosas (BATUT e BOISTARD, 1994 e HENNECKE, 1997). FixK em *S. meliloti* regula negativamente sua própria expressão, ativando o gene *fixT*, cujo produto inibe o sistema FixL-FixJ (FOUSSARD, *et al*, 1997).

A existência de uma região gênica homóloga à região dos genes *fix* de *Bradyrhizobium sp* e também de *Sinorhizobium meliloti* em *Herbaspirillum seropedicae* pode sugerir uma similaridade do sistema de regulação da expressão dos genes *fix* de *H. seropedicae*, onde aparentemente há a ocorrência de um operon *fixGH*, um operon *hemNhs271.0359fixIS* e um *fixNOQP*. Embora não haja a presença de um gene *fixQ* na anotação do genoma de *H. seropedicae*, a busca de ORFs (Figura .6) na região de espaçamento entre os genes *fixO* e *fixP*, (nucleotídeos de 33165 a 32970 pb),

sugere a presença de um gene *ccoQ* ou *fixQ* que codifica para subunidade CcoQ de uma citocromo c oxidase de *Janthinobacterium sp. Marseille*, sugerindo a existência de um operon *fixNOQP* em *H.seropedicae*..

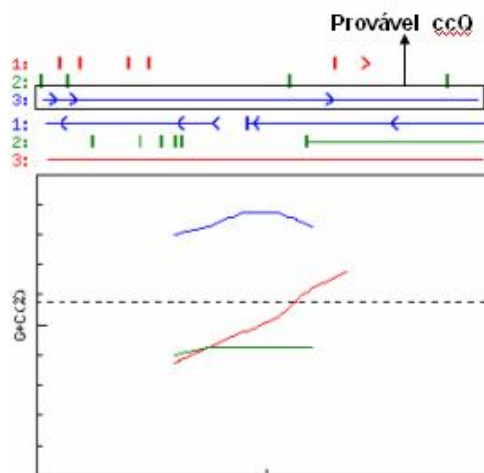


Figura 6 – Busca de ORFs na região de 33165 a 32970 pb no genoma de *H.seropedicae*, destacando-se a possível ORF para *ccoQ*. O programa utilizado foi o Frameplot 2.3.2 (ISHKAWA e HOTTA, 1999).

A análise da região da vizinhança do gene *fnr2* (Figura 7) no genoma de *H.seropedicae*, utilizando-se o alinhamento das seqüências de aminoácidos das ORFs próximas a *fnr2*, contra o banco de dados STRING, não revelou nenhuma semelhança no padrão de vizinhança gênica com outros organismos.

Apesar disso, a aproximadamente 415 pares de base do gene *fnr2* há a presença de uma provável proteína da família AraC “arabinose regulator”, que é um fator de transcrição que em *E.coli* regula a transcrição de diversos genes e operons envolvidos no transporte e catabolismo da arabinose. Em *E. coli* há um processo de co-regulação entre AraC e outro regulador transcricional, o CRP, da família Crp-Fnr assim como FNR2. Na ausência de glucose há a presença de altos níveis de cAMP na célula. Assim, quando disponível, a l - arabinose liga-se a AraC e o cAMP forma um complexo dimérico com CRP, levando a co-regulação dos operons relacionados ao transporte e catabolismo de arabinose (GALLEGOS, *et al.*, 1997, REEDER e SCHLEIF, 1991, HENDRICKSON, FLAHERTY e MOLZ, 1992).

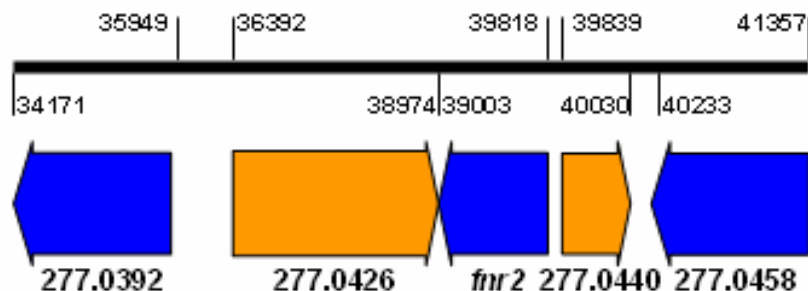


Figura 7 – Organização estrutural da região do gene *fnr2* no genoma de *Herbaspirillum seropedicae*. HS 277.0392 provável DNA polimerase IV, HS 277.0426 provável AMP-dependente sintetase e ligase, *fnr2* – Ativador transcricional FNR2, HS 277.0440 – proteína hipotética, HS 277.0458 – Provável ativador transcricional da família AraC. A linha preta acima dos diagramas dos genes indica as distâncias em pares de base entre cada gene no genoma.

A análise da região da vizinhança do gene *fnr3* (Figura 8) no genoma de *H.seropedicae*, revelou a presença de um possível operon *fnr3hs236.206hs236.0198cpdA*, considerando-se que não foi detectada nenhum promotor clássico entre esses genes. A submissão das seqüências de aminoácidos das ORF HS 236.0206, HS 236.0198 e do gene *cpdA*, revelou a existência da conservação deste padrão de vizinhança ao gene *fnr3* em *Mesorhizobium loti* (Rhizobiales), *Rhodospirillum rubrum* e *Magnetospirillum magneticum* (Rhodospirillales) (Figura 9), embora o gene *fnr3* não esteja constituindo uma única unidade transcricional com estes genes vizinhos homólogos encontrados nestes organismos.

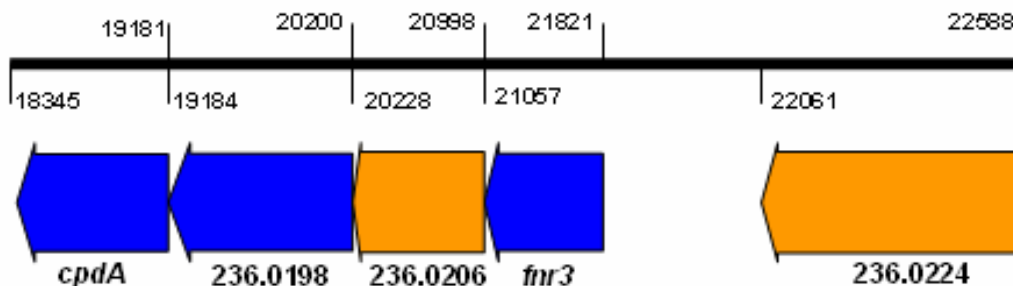


Figura 8 – Organização estrutural da região do gene *fnr3* no genoma de *Herbaspirillum seropedicae*. *cpdA* – provável cAMP fosfodiesterase, HS 236.0198 – provável esfingosina quinase, HS 236.0206 – provável ácido fosfatídico fosfatase do tipo2, *fnr3* – Ativador transcricional FNR3, HS 236.0224 – provável nicotinamidase. A linha preta acima dos diagramas dos genes indica as distâncias em pares de base entre cada gene no genoma.

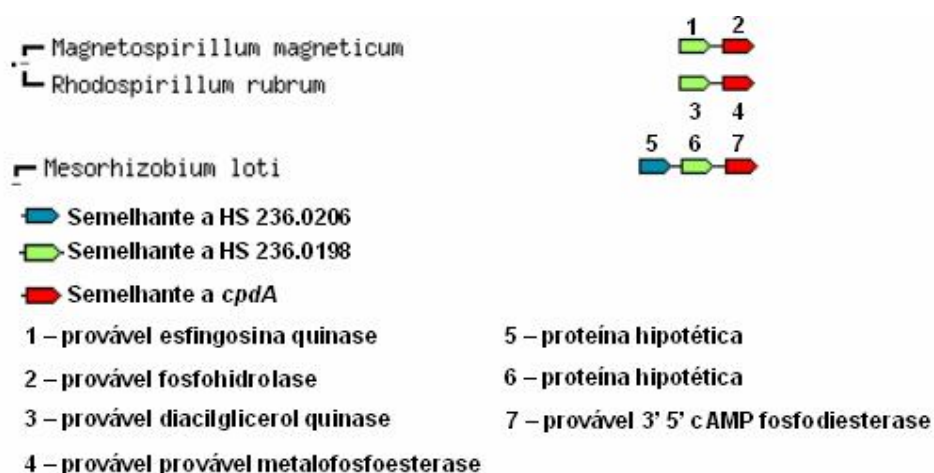


Figura 9 – Padrão de vizinhança gênica gerado pelo banco de dados STRING.

A análise dos domínios conservados, através do programa Pfam, das proteínas hipotéticas de *Mesorhizobium loti* semelhantes a HS 236.0206 e HS 236.0198, revelou que ambas possuem os domínios conservados PAP2 e o domínio catalítico de diacilglicerol quinase, respectivamente.

Em *Escherichia coli*, o gene *cpdA*, codifica uma cAMP fosfodiesterase, que hidrolisa cAMP, uma importante molécula regulatória que influencia o nível de expressão dos genes regulados pela proteína CRP (IMAMURA, 1996).

As ORFs HS 236.0192 (gene *cpdA*) e HS 236.0198 de *H.seropedicae* foram anotadas durante o projeto de sequenciamento genômico deste organismo, como sendo similares respectivamente aos genes ml19676 e ml19677 de *Mesorhizobium loti*. Acessando o genoma deste organismo, por meio do banco de dados RhizoBase (Item 3.14), a sequência de aminoácidos da ORF HS 236.0206 foi submetida a uma busca de similaridade contra o genoma de *M. loti*. Esta busca revelou que HS 236.0206 tem 27% de similaridade com o gene ml19678 de *M. loti*.

Durante a verificação da organização dos genes ml19676, ml19677 e ml19678 no genoma de *M. loti* pode-se inferir que estes genes ml19676, ml19677 e ml19678 estão provavelmente organizados em um operon (Figura 10), confirmando as análises prévias feitas através do banco de dados STRING. Até o momento, ainda não se tem dados experimentais que confirmem que este operon exista em *M. loti*, dificultando inferências a cerca de uma possível função para o possível operon de *H.seropedicae*, que inclui o

gene *fnr3* juntamente com os genes homólogos a ml19676, ml19677 e ml19678 de *M. loti*.

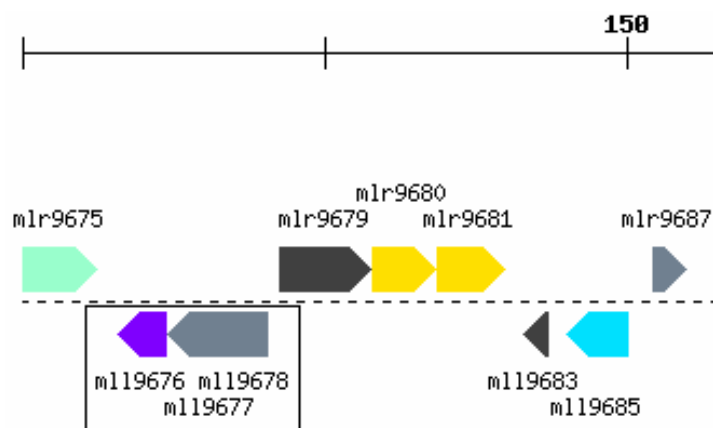


Figura 10 – Organização estrutural da região dos genes ml19676, ml19677 e ml19678 de *Mesorhizobium loti*. A região do possível operon formado por estes genes está destacada em uma caixa.

Por fim, estas características de identidade genômica observadas para os três genes *fnr* de *Herbaspirillum seropedicae* podem sugerir algumas implicações biológicas importantes, que serão discutidas ao longo deste trabalho. Alguns padrões de identidade genômica podem reforçar predições funcionais para proteínas que ainda não são caracterizadas funcionalmente, assim como as proteínas FNR de *H. seropedicae*, porém identificadas de acordo com similaridade com proteínas conhecidas que vêm sendo alvo de caracterização genética e bioquímica.

4.2 ANÁLISE *in silico* DAS PROTEÍNAS FNR DE *Herbaspirillum seropedicae*

Nos últimos anos a conclusão de um grande número de projetos de sequenciamento de genomas bacterianos, têm aumentado significativamente o número de proteínas integrantes da família Crp-Fnr dos reguladores transcricionais, por meio de análises *in silico* (KÖRNER, SOFIA e ZUMFT, 2003). Sendo assim, as ferramentas de bioinformática têm ganho muita importância na análise e identificação de domínios de proteínas (MCGUIRE, HUGHES, e CHURCH, 2000; LIU e ROST, 2003).

A análise *in silico* foi feita a partir da seqüência primária de aminoácidos deduzida dos genes *fnr1*, *fnr2* e *fnr3* identificados durante o projeto de sequenciamento do genoma da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (Projeto GENOPAR). As três proteínas análogas a FNR de *H. seropedicae* foram comparadas com as proteínas FNR de *E.coli*, organismo no qual as inúmeras funções de FNR é mais bem compreendida e também com a FNR de *Klebsiella pneumoniae*, um diazotrofo de vida livre, em que já se tem um modelo bem definido para a via de regulação da NifA envolvendo a proteína FNR.

As proteínas FNR de *E. coli* e *K. pneumoniae* possuem 98% de identidade, sendo que dos 250 resíduos de aminoácidos há apenas um “*mismatche*” e quatro substituições, sendo três altamente conservadas e uma pouco conservada, porém estas substituições não estão presentes em regiões pertencentes a domínios modulares. Em *E. coli* a proteína FNR apresenta em sua região N-terminal um domínio com quatro resíduos de cisteínas ($^{16}\text{Cx}_3\text{Cx}_2\text{Cx}_5\text{C}^{29}$), dentre o quais, os resíduos Cys20, 23 e 29, estão envolvidos na atividade da proteína, uma vez que foi demonstrado que proteínas FNR mutantes nestes resíduos, perdem a atividade. (SHARROCKS, GREEN e GUEST, 1990; MELVILLE e GUNSALUS, 1990). No domínio regulatório da proteína FNR de *Escherichia coli* há um quarto resíduo de cisteína, a Cys122, que também é fundamental para a atividade da proteína. Este resíduo possui um espaçamento ideal em relação aos resíduos Cys20, 23 e 29, na proteína FNR de *E. coli*, o que permitiu caracterizar esta proteína, como sendo do tipo ferredoxina, indicando que FNR tenha um grupamento regulatório Fe-S. Em

1996 Lazazzera e colaboradores determinaram experimentalmente a presença do grupamento Fe-S.

Na proteína FNR de *E. coli* há a presença de um domínio de ligação para o cAMP altamente conservado. Este domínio é constituído por uma alfa hélice e oito folhas beta, porém os resíduos que ligam o cAMP não são conservados. Porém a estrutura de folhas beta da proteína FNR é importante para a sua atividade, tendo em vista que este domínio contém a Cys122, que participa da formação do grupamento Fe-S (KILEY e REZNIKOJ, 1991). Já no domínio C-terminal há um motivo hélice-volta-hélice de ligação sítio específica ao DNA altamente conservado, que liga-se a uma seqüência simétrica (TTGAT X₄ ATCAA) muito similar a da proteína CAP (WEBER e STEITZ, 1987).

As regiões modulares acima descritas para a FNR de *E.coli*, estão presentes nas três proteínas análogas a FNR encontradas em *H. seropedicae* (Figura 11), muito embora a identidade entre estas proteínas não seja muito grande. Porém tendo em vista que *E.coli* é pertencente a classe γ das proteobactérias, e que *H. seropedicae* é pertencente a classe β das proteobactérias esta diferença pode ser justificável. Apesar disso, foi observada uma grande similaridade estrutural entre as proteínas FNR de *H. seropedicae* com a proteína CAP de *Escherichia coli*, assim como observado em relação a proteína FNR de *E.coli*, como será explorado mais detalhadamente no item 4.2.

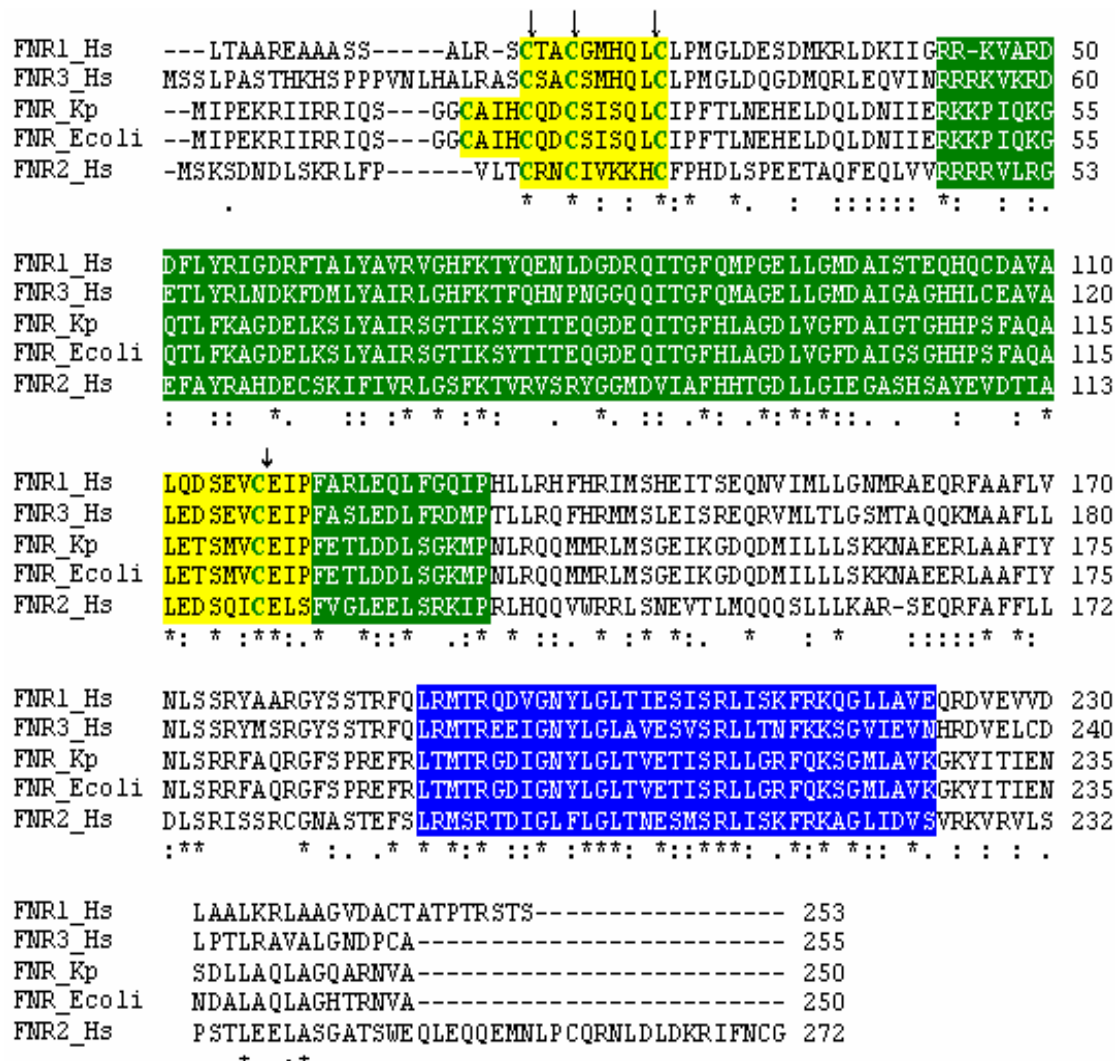


Figura 11 - Alinhamento entre as três proteínas análogas a FNR de *Herbaspirillum seropedicae* e as proteínas FNR de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. O programa utilizado foi o ClustalW. Os aminoácidos idênticos estão indicados com um asterístico (*), os aminoácidos altamente conservados estão indicados com dois pontos (:) e os pouco conservados estão indicados com um ponto (.). Na caixa amarela está indicada a região com os resíduos de Cys (fonte verde) essenciais para a formação do grupamento Fe-S. Na caixa verde está indicado o domínio conservado de ligação ao cAMP e na caixa azul o domínio hélice-volta-hélice de ligação ao DNA.

O alinhamento entre as seqüências de aminoácidos das proteínas FNR₁, FNR₂ e FNR₃ (Figura 11) com as seqüências de aminoácidos das proteínas FNR de *E.coli* e *K.pneumoniae* mostrou várias regiões de homologia entre

estas proteínas. Os resíduos de cisteína fundamentais para a formação do grupamento Fe-S estão presentes em todas as proteínas mostradas no alinhamento sem nenhuma substituição e também com o espaçamento ideal para a formação de tal grupamento.

Dentre os domínios conservados presentes nas proteínas FNR analisadas, o domínio hélice-volta-hélice de ligação ao DNA, presente na região C-terminal, é mais conservado em relação aos outros domínios, entre todas proteínas do alinhamento e com a proteína CAP de *E. coli* (Figura 12), reforçando os indícios de que em *H. seropedicae* as proteínas FNR identificadas tenham uma função reguladora bastante importante.

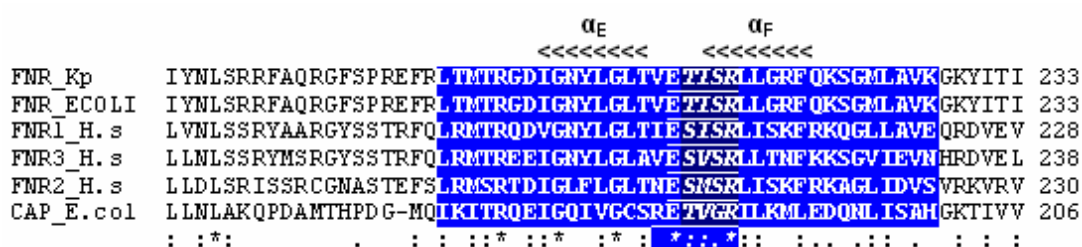


Figura 12- Alinhamento entre as regiões C-terminal das três proteínas análogas a FNR de *Herbaspirillum seropedicae* e as proteínas CAP e FNR de *Escherichia coli* e FNR de *Klebsiella pneumoniae*. O programa utilizado foi o ClustalW. Os aminoácidos idênticos estão indicados com um asterístico (*), os aminoácidos altamente conservados estão indicados com dois pontos (:) e os pouco conservados estão indicados com um ponto (.). Na caixa azul está indicado a região do domínio H-T-H de ligação ao DNA. Na caixa azul marinho e em *itálico* está indicada a região de homologia identificada para as proteínas regulatórias semelhantes a CAP. Sublinhado, encontra-se o motivo que distingue proteínas FNR de proteínas CAP.

Segundo Cossart e Gicquel-Sanquey (1982), as proteínas regulatórias semelhantes a CAP contém um tetrapeptídeo conservado com o consenso Thr-Val-X₁-Arg. Em *E. coli* e em *K.pneumoniae* há um tetrapeptídeo homólogo altamente conservado (Thr-Ile-Ser-Arg). Nas três proteínas FNR de *H. seropedicae* também foi observado um tetrapeptídeo homólogo bastante conservado com o consenso Ser-X₁-Ser-Arg, sendo que nas proteínas FNR₁, FNR₂ e FNR₃, X₁ é equivalente a Ile, Met e Val respectivamente (Figura 12).

A hélice α_f , deduzida a partir da estrutura da proteína CAP e de análises de predição de estrutura secundária, destacada na figura 12, contém resíduos de aminoácidos que interagem com o sítio de ligação da FNR ao DNA, assim como na proteína CAP (SPIRO e GUEST, 1987 ; SPIRO *et al*, 1990). Nas proteínas FNR alinhadas na figura 9, a região da hélice α_f é altamente conservada, inclusive nas três proteínas FNR de *H.seropedicae* (Também discutido por RAEDER,2003).

Ainda, neste alinhamento da figura 12, observou-se que as proteínas FNR de *H.seropedicae*, *E.coli* e *K.pneumoniae* possuem um outro motivo altamente conservado na hélice α_f . Este motivo apresenta o seguinte consenso Glu-X₂-Ser-Arg. Em 1994, Spiro, sugeriu que a presença deste motivo era determinante para a classificação das proteínas da família Crp-Fnr dos reguladores transcricionais. As que possuísem este motivo seriam homólogas a FNR, enquanto que as homólogas a CRP apresentariam o motivo Arg-Glu-X₃-Arg.

A partir do alinhamento das proteínas FNR de *H.seropedicae*, *E.coli* e *K.pneumoniae* com as proteínas FNR de outros organismos (Figura 13) pode-se ter uma idéia do grau de conservação de cada domínio modular já citado.

```

                                ↓ ↓ ↓
FNR1_H.s -----LTAAREA-----AASSALR-SCTACGMHQ LCLPMGLDESDMKRLDK 40
FNR_J.m -----MSQASPSTTDPA-----LSVMALRASCSCTSMHQ LCLPMGLGEMDMRDLK 46
FNR3_H.s --MSSLPASTHKHSPPP-----VNLHALRASCSACSMMHQ LCLPMGLDQGMQRLEQ 49
FNR_K.p -----MIPEKRIIRRIQ-----SGGCAIHCQDCSISQLCIPFTLNEHELDQLDN 44
FNR_E.coli -----MIPEKRIIRRIQ-----SGGCAIHCQDCSISQLCIPFTLNEHELDQLDN 44
FNR_E.c -----MIPEKRIIRRIQ-----SGGCAIHCQDCSISQLCIPFTLNEHELDQLDN 44
FNR_C.v -----MSEQNHTSLHT-----LKISCS SCSLRELCLPVGLNREEMGQLDA 40
FNR_A.sp MWLTWINAANLLRIRSKFIVQMKA VPI TVAGLKTACSQCNLVE LCLPFGMSENEIDRLDE 60
FNR_C.t ---MFVSCPAAISSRFQL LTS---IPVTEMSPRCSTCAMGQLCLPVGMSQQDLAKIDT 52
FNR2_H.s ----MSKSDNDLSKRLFP-----VLTCRNCIVKKHCFPHDLSPEETAQFEQ 42
                                * * : : * : * : . : : :

FNR1_H.s IIGRR-KVARDDFLYRIGDRFTALYAVRVGHFKTYQENLDGDRQITGFQMPGELLGMDAI 99
FNR_J.m IIGRRRKVARDDYLRYMGDAFTNLYAVRVGHFKTCQINAGGEQITGFQMTGELLGMDAI 106
FNR3_H.s VINRRRKVKRDETLYRLNDKFDMLYAIRLGHFKTTFQHNPNNGGQITGFQMGAGELLGMDAI 109
FNR_K.p IIERKKPIQKGQTLFKAGDELKSLYAIRSGTIKSYTITEQGDEQITGFHLAGDLVGFDAL 104
FNR_E.coli IIERKKPIQKGQTLFKAGDELKSLYAIRSGTIKSYTITEQGDEQITGFHLAGDLVGFDAL 104
FNR_E.c IIERKKPIQKGQTLFKAGDELKSLYAIRSGTIKSYTITEQGDEQITGFHLAGDLVGFDAL 104
FNR_C.v VIRQSRRLKRGEYLFRRSGESFKSLYAIRTGFFKTCVASQDGREQVTGFLMSGELMGLDGI 100
FNR_A.sp LVQARRKIKRQQLYRAGDPFEAIYAIRTGSKFDVLLDGRDQVTGFMGTGELGLDGI 120
FNR_C.t LVQERIRVHKGETLYRMGDPPLTAVYAIRGTLKTHVTITDGRSQITGFHLGCEILVGLDGI 112
FNR2_H.s LVVRRRRVLRGEFAYRAHDECSKIFIVRLGSKFTRVRSRYGGMDVIAFHHTGDLGLGIEGA 102
: : : : : : : : * * : * : * : : . * : * : : : :

                                ↓
FNR1_H.s STEQHQCDAVALQDSEVCEIPFARLEQLFGQIPHLLRHFRIMSSHEITSEQNVMILLGNM 159
FNR_J.m STDRHHCNAVALEDSEVCEIPFPRLLEELFGTMTPTLLRHFRIMSSQETREQSVMLLLGNM 166
FNR3_H.s GAGHHLCEAVALDSEVCEIPFASLEDLFRDMPTLLRQFHRMMSLEISREQRVMTLGLSM 169
FNR_K.p GTGHHPSFAQALETSMVCEIPFETLDDL SGKMPNLRQQMMRLMSGEIKGDQDMILL SKK 164
FNR_E.coli GSGHHPSFAQALETSMVCEIPFETLDDL SGKMPNLRQQMMRLMSGEIKGDQDMILL SKK 164
FNR_E.c GTGHHPSFAQALETSMVCEIPFETLDDL SGKMPNLRQQMMRLMSGEIKGDQDMILL SKK 164
FNR_C.v SSSNHSCDAVALEDSEVCELPFTRMESL CRDIPSLQHHFYRLMSREIVRDQNVMLLLGNM 160
FNR_A.sp SSEVHSCNAIALEDSEVCVIAVGKLEEL SREVEGLQHQFHKVMSREIVRDHGVMMLLGSM 180
FNR_C.t GEMQHASDATALEDTEVCVVRMNDLQSL SADLP SLQQQFLRLMGKEITHDQLMLVTGLSM 172
FNR2_H.s SHSA YEVD TIALED SQICEL SFVGLEEL SRKIPRLHQQVWRRLSNEVTLMQQQSLLLK-A 161
. : : * : : : : : : : * : : : : . * : : : *

                                ↓
FNR1_H.s RAEQRFAAFLVNLSSRYAARGYSSTRFQ LRMTRQDVGNYLGLTIESISRLISKFRKQGGL 219
FNR_J.m RAEQRFAAFLVNLASRYMARGYSTSFQ LRMSREDIGNYLGLTIESISRLISKFKKQGGL 226
FNR3_H.s TAQQKMAAFLNLSSRYMSRGYSTSTRFQ LRMTRREEIGNYLGLAVESVSRLLTMFKKSGVI 229
FNR_K.p NAEERLAAFIYNLSRRFAQRGFS PREFR LTMTRGDIGNYLGLTVETISRLLRGRFQKSGML 224
FNR_E.coli NAEERLAAFIYNLSRRFAQRGFS PREFR LTMTRGDIGNYLGLTVETISRLLRGRFQKSGML 224
FNR_E.c NAEERLAAFIYNLSRRFAERGFS PREFR LTMTRGDIGNYLGLTVETISRLLRGRFQKSGML 224
FNR_C.v KAEERLAAFLNLSQLSTRGFAANDFT LRMSREEIGSFLGLKLETVSRTLSKFQQQGWI 220
FNR_A.sp RAEERLAAFLNMSQRFTARGFSAAEFHLRMTREEIGSYLGLKLETVSRAFSRFOEEGLV 240
FNR_C.t RAEERLAAFLINLSERLSARGYSAEFVLRMSREEIGSYLGLKLETVSRLF SRFAEAGLI 232
FNR2_H.s RSEQRFAFFLLDLSRISSRCGNASTEFSLRMSRTDIGLFLGLTNESMSRLISKFRKAGLI 221
: : : * * : : : * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

FNR1_H.s AVEQRDVEVVDLAALKRLAAGVD ACTATPTRST----- 252
FNR_J.m KVNREIE LLDLTLLKAMAAGTETCS----- 252
FNR3_H.s EVNHRDVELCDLPTLRAVALGNDPCA----- 255
FNR_K.p AVKGYIT IENSDLLAQLAGQARNVA----- 250
FNR_E.coli AVKGYIT IENNDALAQLAGHTRNVA----- 250
FNR_E.c AVKGYIT IENGELAVLAGHARNVA----- 250
FNR_C.v TVDHKHIQLVQLAELKNLISGCMHADGH----- 248
FNR_A.sp TVQKHIRILD SGGLKKLIHQHPACR----- 266
FNR_C.t QIRQRHVKLIDIDGIKQLYSRSC----- 255
FNR2_H.s DVSVRKVRVLSPTLEELASGATSWEQLEQQEMNLPQCRNLDDKRIFF 269
: : : : . : :

```

Figura 13 - Alinhamento entre as três proteínas análogas a FNR de *Herbaspirillum seropedicae* e outras proteínas FNR. Os aminoácidos idênticos estão indicados com um asterístico (*), os aminoácidos altamente conservados estão indicados com dois pontos (:) e os pouco conservados estão indicados com um ponto (.). As cisteínas essenciais para a formação do grupamento Fe-S estão indicados com seta ↴. Na caixa verde está indicado a região do domínio conservado de ligação ao cAMP na caixa azul o domínio hélice-volta-hélice de ligação ao DNA. H.s – *Herbaspirillum seropedicae*, J.m *Janthinobacterium* sp. Marseille, K.p – *Klebsiella pneumoniae*, E.c1 – *Escherichia coli* K12, E.c – *Enterobacterium cloacae*, C.v – *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, A.sp – *Azoarcus* sp, C.t – *Cupriavidus taiwanensis*.

No alinhamento das proteínas FNR de *H.seropedicae* com as proteínas FNR de diversos outros organismos (Figura 13), observa-se que os quatro resíduos de cisteína essenciais para a formação do grupamento Fe-S estão altamente conservadas em todos os organismos analisados, inclusive com o espaçamento ideal para formação do grupamento Fe-S.

Neste alinhamento também pode-se inferir que o domínio hélice-volta-hélice é melhor conservado do que o domínio regulatório, tendo em vista que o primeiro apresenta uma proporção maior de aminoácidos conservados em relação ao segundo. Dos 33 aminoácidos que compõe a região do domínio hélice-volta-hélice, 11 são idênticos (33%), 9 são altamente conservados (27%), 1 é pouco conservado (0,03%) e 12 (37%) são substituídos. Já no domínio de ligação ao cAMP, dos 93 aminoácidos que o compõe, 11 são idênticos (12%), 27 (29%) são altamente conservados, 7 (0,075%) são pouco conservado e 50 (51,5%) foram substituídos.

4.3 CONSTRUÇÃO DO MODELO ESTRUTURAL TEÓRICO PARA AS PROTEÍNAS FNR₁, FNR₂ E FNR₃ DE *Herbaspirillum seropedicae*.

Modelos estruturais de proteínas são de grande interesse para o planejamento e análise de experimentos biológicos, como por exemplo, mutagênese sítio-dirigida ou busca de inibidores específicos baseados em estrutura. Os modelos baseados em homologia têm ganhado grande importância, tendo em vista a discrepância entre o número de estruturas tridimensionais determinadas experimentalmente em relação ao número de seqüências de proteínas conhecidas (ARNOLD *et al.*, 2006). Para se ter um panorama, em Novembro de 2005 o “*Protein Data Bank (PDB)*” (WESTBROOK *et al.*, 2003) tinha cerca de 33 mil estruturas de proteínas determinadas experimentalmente depositadas, enquanto que o “*UniProt protein knowledge database*” (BAIROCH *et al.*, 2005) tinha mais de 2,3 milhões de seqüências depositadas (ARNOLD *et al.*, 2006).

A geração dos modelos de homologia baseados na estrutura conhecida de uma proteína (“*template*”) a partir de uma seqüência de aminoácidos de uma proteína em estudo (“*target*”), é freqüentemente possível, considerando-se que os modelos tridimensionais das proteínas encontrados na natureza são limitados, e também freqüentemente mais conservados em relação suas seqüências de aminoácidos. Para a construção dos modelos estruturais teóricos baseados em homologia, das proteínas FNR de *H. seropedicae*, foi utilizado o programa SWISS-MODEL (GUEx e PEITSCH 1997, SCHWEDE *et al.*, 2003, KOPP e SCHWEDE, 2004 e ARNOLD *et al.*, 2006), utilizando-se as seqüências de aminoácidos deduzidas dos genes *fnr1*, *fnr2* e *fnr3* identificados durante o projeto de sequenciamento do genoma da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (resultados não publicados). A análise das estruturas das proteínas FNR de *H. seropedicae* e também a sobreposição das mesmas com as estruturas de outras proteínas foi feita utilizando-se os programas VMD “*Visual Molecular Dynamics*” (HUMPHREY, DALKE e SCHULTEN, 1996) e também o programa PyMol (Copyright © 2008 DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, 2002, USA < <http://www.pymol.org/>>).

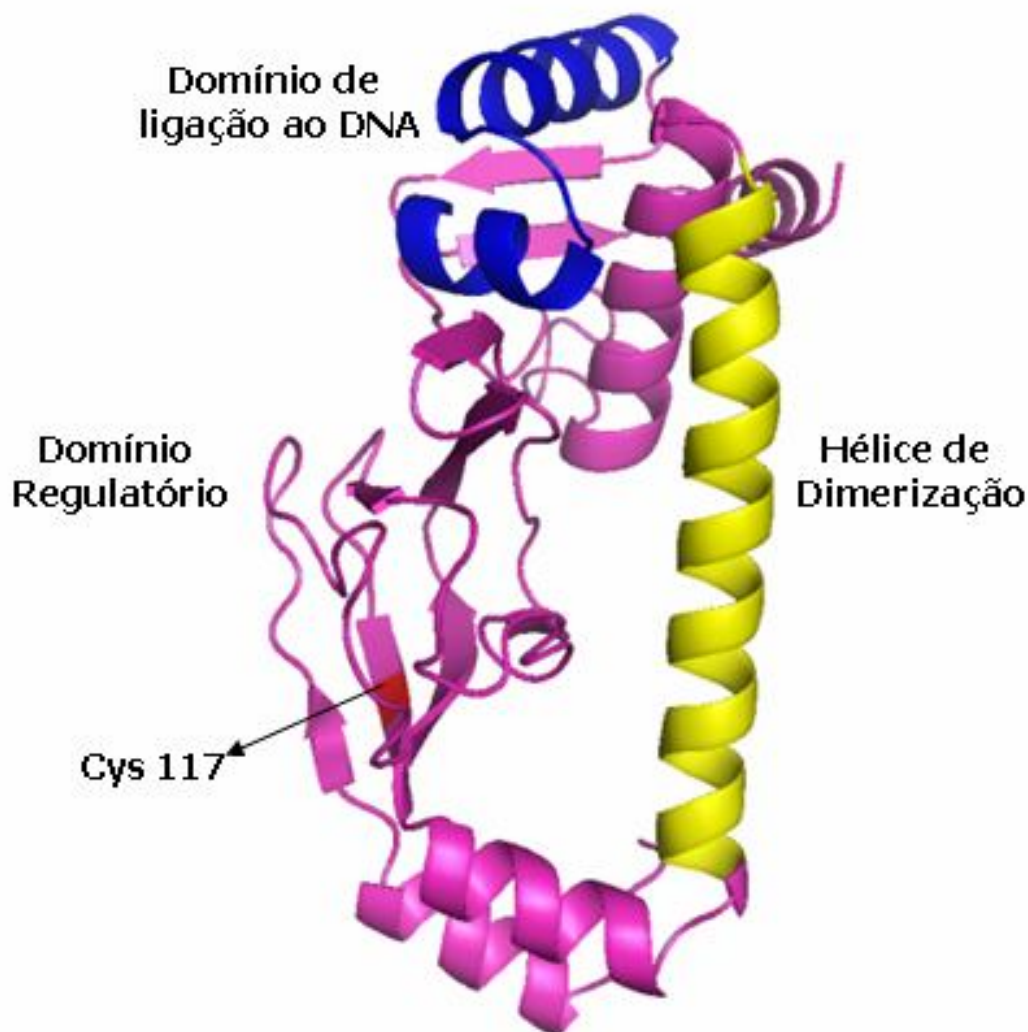


Figura 14 – Modelo estrutural tri-dimensional do monômero da proteína FNR₁ de *H. seropedicae* baseado na estrutura conhecida de um regulador transcricional da família Crp/Fnr de *Porphyromonas gingivalis*, depositada no *Brookhaven Protein Data Bank* arquivo 2gau.pdb. O modelo foi gerado utilizando-se o Programa SWISS MODEL, e a identificação dos domínios modulares foi feita através de análises de estrutura secundária feitas com o programa PSIPRED e também através da comparação do modelo estrutural da FNR de *Escherichia coli* baseado na estrutura da proteína CAP, depositada no *Brookhaven Protein Data Bank* arquivo 1cgp.pdb (CRACK, GREEN and THOMSON, 2004) e 1i5z.pdb. Em vermelho está destacado a Cys 117 essencial para a formação do grupamento Fe-S, e amarelo a hélice de dimerização e em azul o motivo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA.

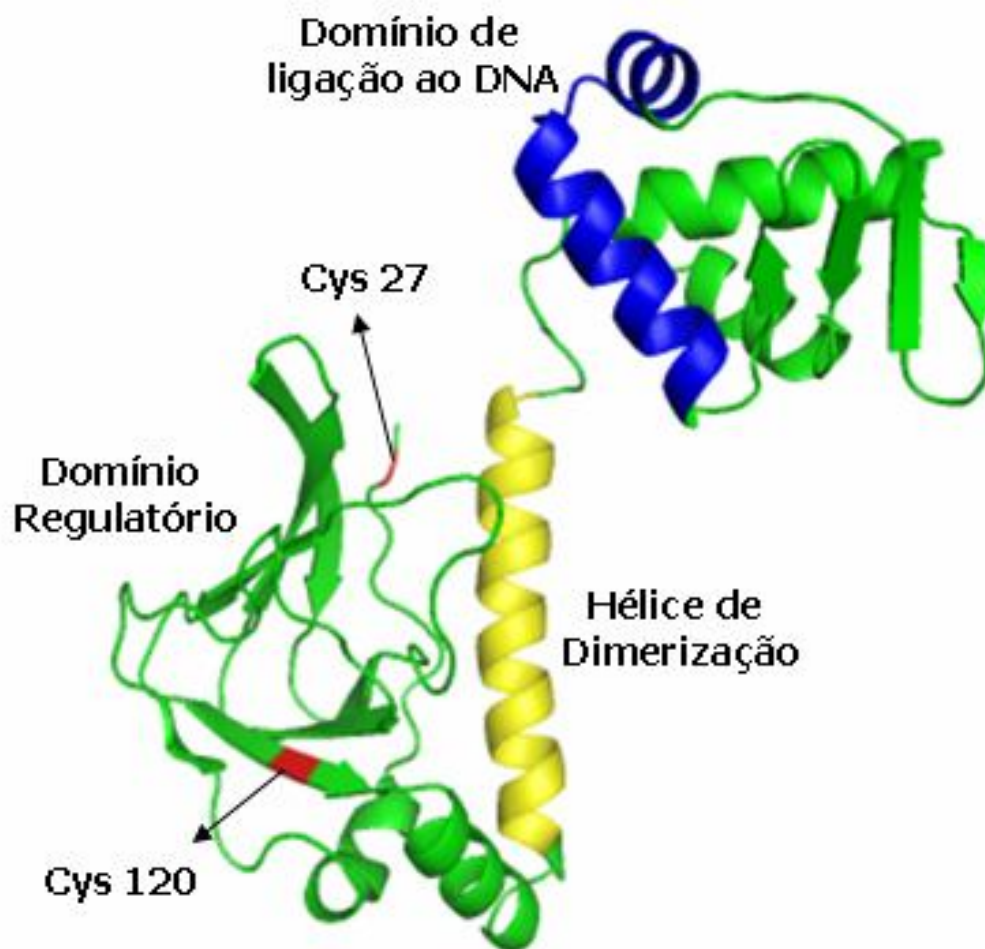


Figura 15 – Modelo estrutural tri-dimensional do monômero da proteína FNR₂ de *H. seropedicae* baseado na estrutura conhecida da proteína CprK oxidada em complexo com o ácido o-clorofenoacético de *Desulfitobacterium hafniense*, depositada no *Brookhaven Protein Data Bank* arquivo 2h6b.pdb. O modelo foi gerado utilizando-se o Programa SWISS MODEL, e a identificação dos domínios modulares foi feita através de análises de estrutura secundária feitas com o programa PSIPRED e também através da comparação do modelo estrutural da FNR de *Escherichia coli* baseado na estrutura da proteína CAP, depositada no *Brookhaven Protein Data Bank* arquivo 1cgp.pdb (CRACK, GREEN and THOMSON, 2004) e 1i5z.pdb. Em vermelho está destacado a Cys 117 essencial para a formação do grupamento Fe-S, e amarelo a hélice de dimerização e em azul o motivo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA.

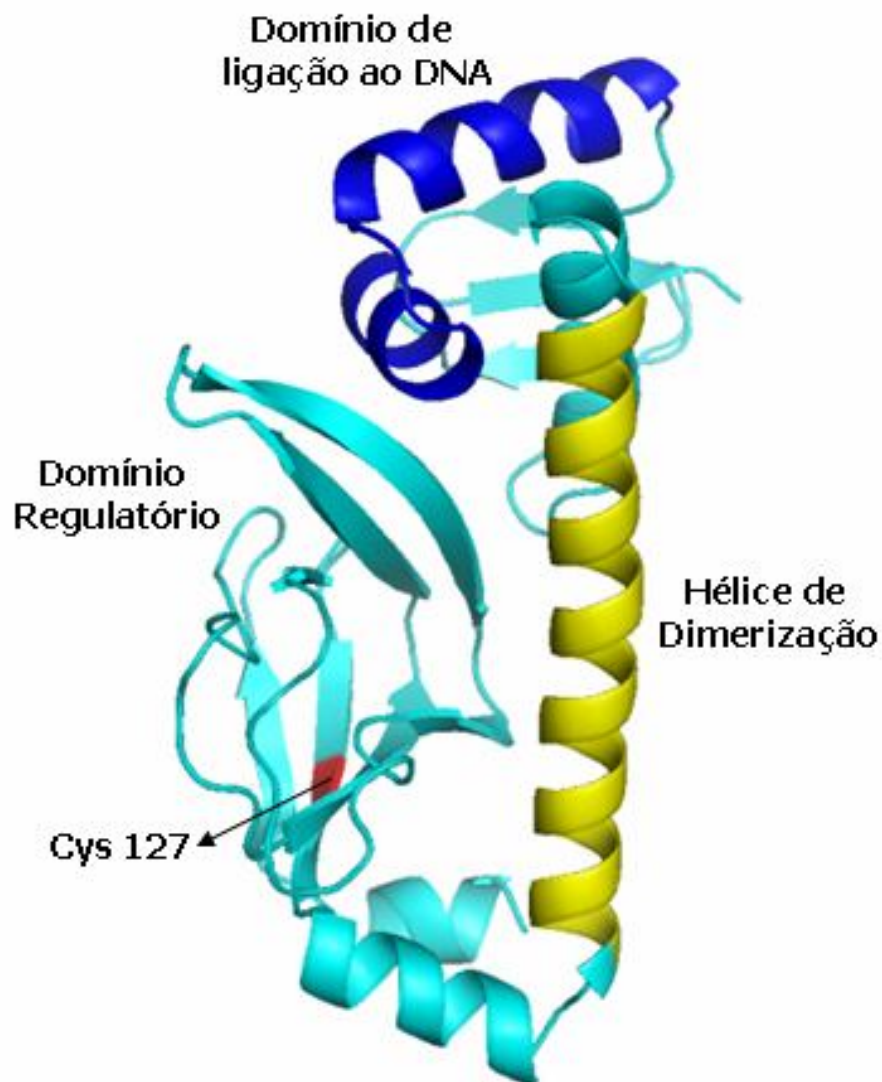


Figura 16 – Modelo estrutural tri-dimensional do monômero da proteína FNR₃ de *H. seropedicae* baseado na estrutura conhecida do fator de virulência de *Pseudomonas aeruginosa* em complexo com cAMP depositada no *Brookhaven Protein Data Bank* arquivo 2oz6.pdb. O modelo foi gerado utilizando-se o Programa SWISS MODEL, e a identificação dos domínios modulares foi feita através de análises de estrutura secundária feitas com o programa PSIPRED e também através da comparação do modelo estrutural da FNR de *Escherichia coli* baseado na estrutura da proteína CAP, depositada no *Brookhaven Protein Data Bank* arquivo 1cgp.pdb (CRACK, GREEN and THOMSON, 2004) e 1i5z.pdb. Em vermelho está destacado a Cys 117 essencial para a formação do grupamento Fe-S, e amarelo a hélice de dimerização e em azul o motivo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA.

Analisando-se as estruturas tridimensionais das três proteínas FNR de *H.seropedicae* (Figuras 14,15 e 16), observa-se que estas possuem os motivos conservados característicos das proteínas FNR, assim como observado na análise da estrutura secundária, reforçando a hipótese de que as três proteínas análogas a FNR de *H.seropedicae*, sejam pertencentes a esta família. Entretanto, ainda não dispomos de resultados experimentais que confirmem isso. Na região N-terminal, por volta das posições 40 e 120, foram observadas a presença de um alfa-hélice e das folhas beta, características do domínio regulatório destas proteínas.

Na região C-terminal, entre as posições 200 e 220, foram identificadas as duas hélices que formam o motivo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA. Por outro lado, não foi possível observar, na estrutura tridimensional das três proteínas FNR de *H.seropedicae*, a presença do grupamento Fe-S, muito embora as cisteínas 117 e 127 para FNR1 e FNR3 respectivamente, e as cisteínas 27 e 120 para FNR₂, tenham sido destacadas na estrutura. Até o momento não existe nenhuma proteína que forme o grupamento Fe-S, com esta região caracterizada estruturalmente.

Em 2004, Crack, Green e Thomson propuseram um modelo para o grupamento Fe-S da proteína FNR de *Escherichia coli*, modelada a partir da estrutura da proteína CAP, baseado no grupamento [2Fe-2S] oxidado de uma ferredoxina da alga verde *Chlorella fusca*, depositada no *Brookhaven Protein Data Bank* arquivo 1awd.pdb (BES, et al 1999). O grupamento Fe-S da FNR de *E.coli* foi modelado utilizando-se o programa SwissPDBviewer (GUEx e PEITSCH, 1997 e GUEx, DIEMAND e PEITSCH, 1999).

Baseado em várias indicações de semelhanças estruturais e funcionais entre as proteínas FNR e CAP de *E. coli* (SCHULTZ, SHIELDS e STEITZ, 1991; KOLB, et al 1993 ; SAWERS, et al 1997 e LI, et al 1998;), e também na observação de que o modelo estrutural teórico para as três proteínas FNR de *H.seropedicae* também apresentava semelhança estrutural com a CAP de *Escherichia coli*, foi realizado a sobreposição, utilizando-se o programa PyMol (DeLano Scientific, San Carlos, CA, 2002, USA < <http://www.pymol.org/>>), entre estas estruturas para verificação da semelhança estrutural observada entre as mesmas.

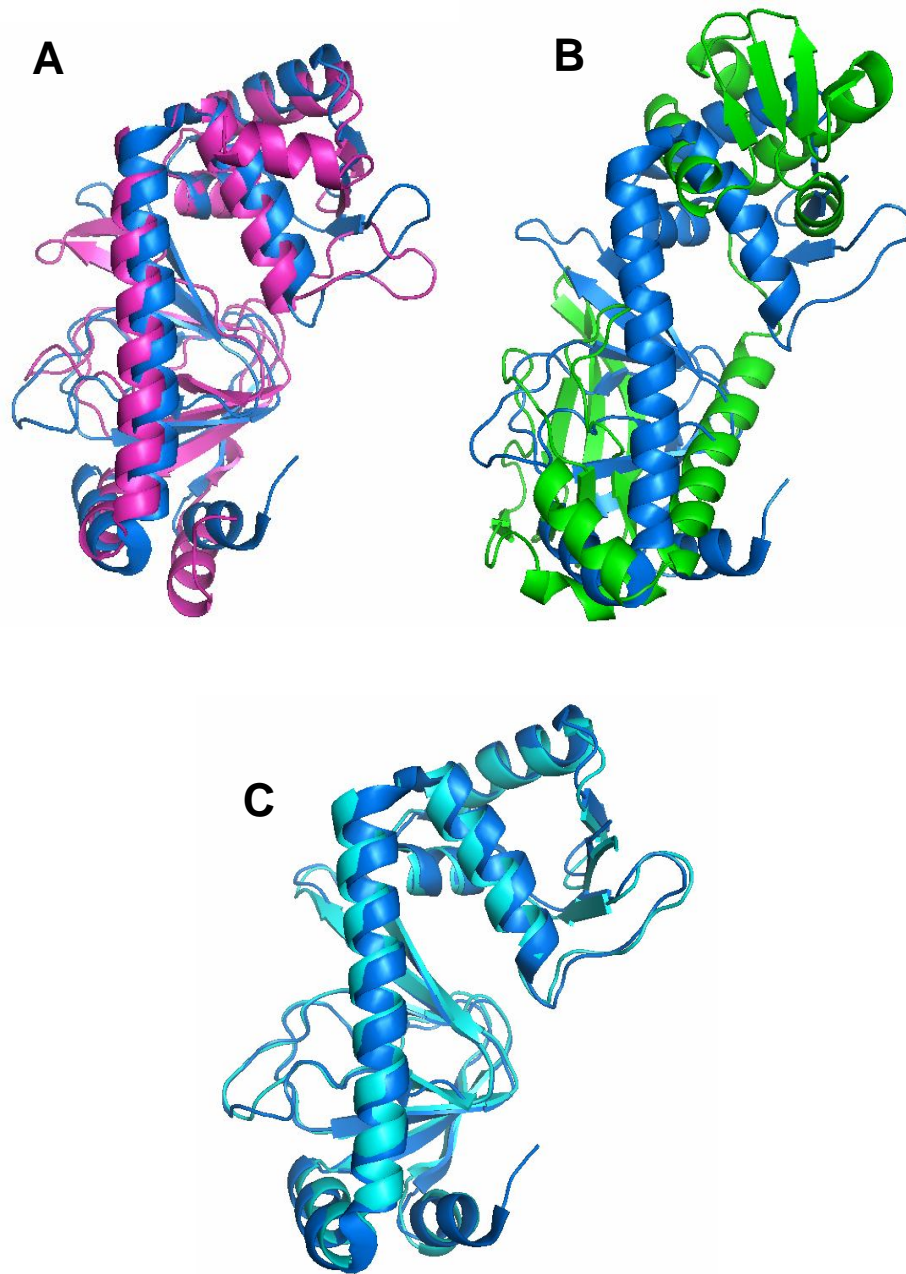


Figura 17 – Sobreposição entre as proteínas FNR de *H. seropedicae* com a proteína CAP de *E. coli*. Nas letras A,B e C encontra-se a sobreposição dos modelos estruturais das proteínas FNR₁ (magenta), FNR₂ (verde) e FNR₃ (verde-água) de *H.seropedicae* com a estrutura da proteína CAP (azul) de *E.coli*, respectivamente.

A sobreposição das estruturas (Figura 17) demonstrou que as estruturas das proteínas FNR₁ e FNR₃ de *H.seropedicae*, têm grande semelhança com a proteína CAP de *E.coli*, assim como observado para a proteína FNR deste

organismo. A estrutura de FNR₂ não apresentou a mesma semelhança com a CAP de *E.coli*, como observado para FNR1 e FNR3.

O alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas FNR e CAP destes organismos, utilizando-se o ClustalW, revelou uma identidade de 18% entre CAP_*E.coli* e FNR_*E.coli*, FNR1_*H.seropedicae* e FNR3_*H.seropedicae*, e uma identidade de 10% CAP_*E.coli* e FNR2_*H.seropedicae*, (Tabela 9), corroborando as diferenças e ou semelhanças estruturais já relatadas. A presença de uma alta similaridade estrutural contrariando a ocorrência de uma baixa similaridade da estrutura primária, é justificável tendo em vista que o número de estruturas tridimensionais de proteínas é limitado, e também porque a sequência de aminoácidos pode variar bastante entre proteínas da mesma família, sem que estas alterações não comprometam a funcionalidade das mesmas.

Tabela 9 – Identidade entre as proteínas FNR de *H. seropedicae*, *E. coli* e *K.pneumoniae* com a proteína CAP de *E.coli*

Nome da Sequência A	Tamanho (aa)	Nome da Sequência B	Tamanho (aa)	Similaridade(%)
CAP <i>E. coli</i>	210	FNR1 <i>H.seropedicae</i>	253	18
CAP <i>E. coli</i>	210	FNR2 <i>H.seropedicae</i>	272	10
CAP <i>E. coli</i>	210	FNR3 <i>H.seropedicae</i>	255	18
CAP <i>E. coli</i>	210	FNR <i>K. pneumoniae</i>	250	18
CAP <i>E. coli</i>	210	FNR <i>E. coli</i>	250	18
FNR1 <i>H.seropedicae</i>	253	FNR2 <i>H.seropedicae</i>	272	36
FNR1 <i>H.seropedicae</i>	253	FNR3 <i>H.seropedicae</i>	255	58
FNR1 <i>H.seropedicae</i>	253	FNR <i>K. pneumoniae</i>	250	42
FNR1 <i>H.seropedicae</i>	253	FNR <i>E. coli</i>	250	42
FNR2 <i>H.seropedicae</i>	272	FNR3 <i>H.seropedicae</i>	255	33
FNR2 <i>H.seropedicae</i>	272	FNR <i>K. pneumoniae</i>	250	30
FNR2 <i>H.seropedicae</i>	272	FNR <i>E. coli</i>	250	30
FNR3 <i>H.seropedicae</i>	255	FNR <i>K. pneumoniae</i>	250	40
FNR3 <i>H.seropedicae</i>	255	FNR <i>E. coli</i>	250	40
FNR <i>K. pneumoniae</i>	250	FNR <i>E. coli</i>	250	98

Diante destas considerações, foi feita a análise da qualidade do modelo estrutural proposto para as proteínas FNR de *H.seropedicae*, considerando-se que quando se constrói o modelo estrutural para uma proteína, mesmo que este não tenha sido obtido a partir de dados experimentais, deve-se levar em conta a qualidade do modelo obtido, tendo em vista que o modelo de homologia gerado pelo programa SWISS-MODEL foi baseado em uma estrutura já determinada e sujeita a diferentes erros experimentais, comprometendo a fidelidade do mesmo. Os estudos de cristalografia de alta resolução com proteínas revelaram que os ângulos conformacionais demonstram preferências por determinados valores esperados de acordo com considerações energéticas simples. Desvios das conformações preferenciais podem ser usados como indicadores de potenciais erros. As limitações impostas pelos arranjos espaciais dos átomos fazem com que os polipeptídeos assumam conformações energeticamente mais favoráveis (RAMAKRISHNAN e RAMACHANDRAN, 1965) . Para cada resíduo de aminoácido, estas conformações podem ser caracterizadas pelos valores dos ângulos de torção Φ (phi) e ψ (psi). A distribuição de Φ e ψ é usualmente chamada de representação gráfica de Ramachandran. (KLEYWEGT e JONES, 1996).

O gráfico de Ramachandran pode demonstrar a qualidade da distribuição dos ângulos Φ e ψ , revelando outras disparidades que podem ter aparecido durante o refinamento da determinação da estrutura. Assim, o gráfico de Ramachandran é o meio mais simples e sensível para se acessar a qualidade de um modelo gerado na ausência de dados experimentais. A grande justificativa para isso é o fato de que os ângulos Φ e ψ (ou a combinação deles) não são usualmente restaurados durante o refinamento dos raios-X. Desta forma, um indicador que demonstre o quanto uma estrutura desvia das áreas preferidas do gráfico de Ramachandran é um requerimento essencial para determinar a qualidade do modelo estrutural de uma proteína (KLEYEWEGT e JONES, 1996). Sendo assim, as estruturas tridimensionais para as proteínas FNR de *H.seropedicae* foram submetidas à análise utilizando-se o programa MolProbity (DAVIS *et al* 2007) e os gráficos de ramachandran obtidos, demonstrados nas figuras 18, 19 e 20, foram analisados para inferências sobre a qualidade do modelo.

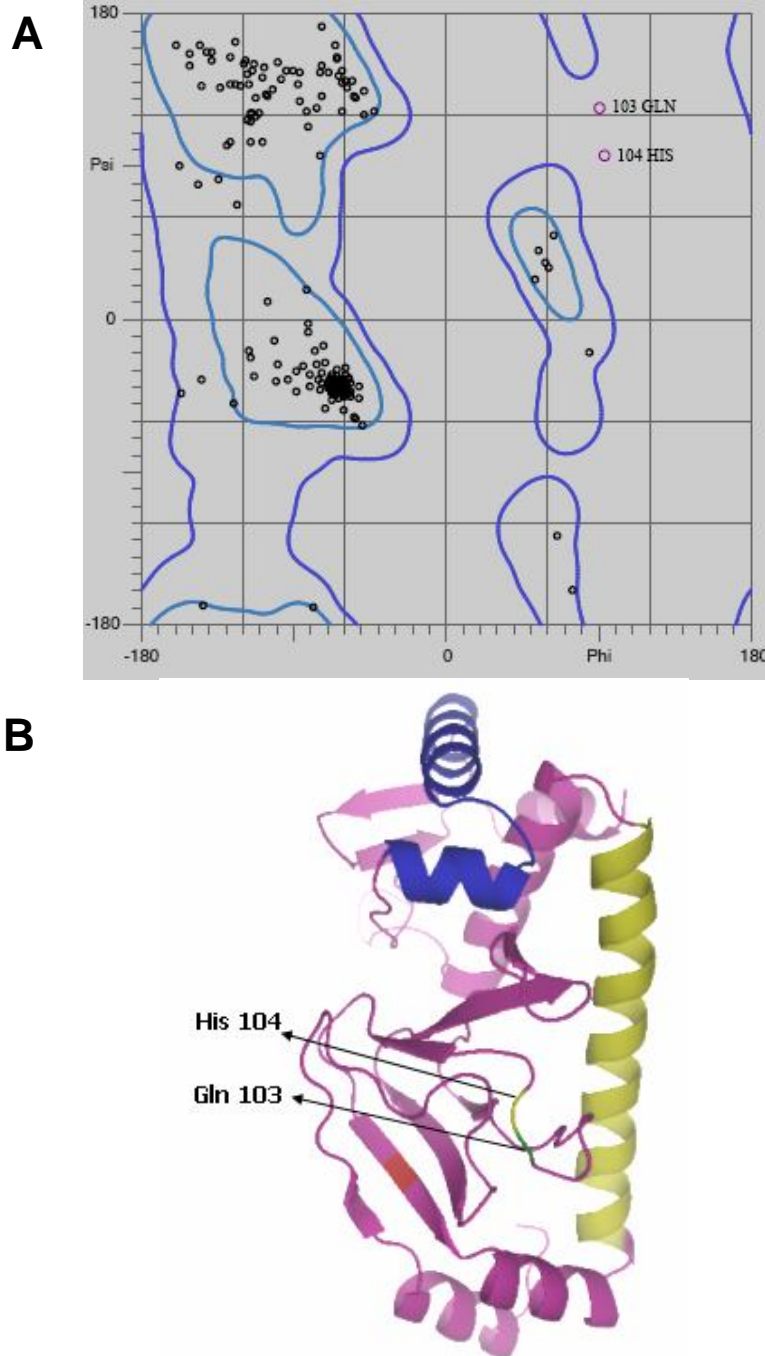


Figura 18 – Análise da qualidade do modelo estrutural da proteína FNR1 de *H.seropedicae*. Em A encontra-se o gráfico de Ramachandran, onde as regiões demarcadas em azul claro mostram as áreas de ângulos de torção favoráveis, e as demarcadas em azul escuro mostram as áreas de ângulos de torção permitidas. Os aminoácidos estão representados por círculos amarelos ou brancos delimitados por rosa. Em B encontra-se a estrutura da proteína FNR1 de *H.seropedicae* com os aminoácidos, que foram plotados em regiões desfavoráveis do gráfico, destacados.

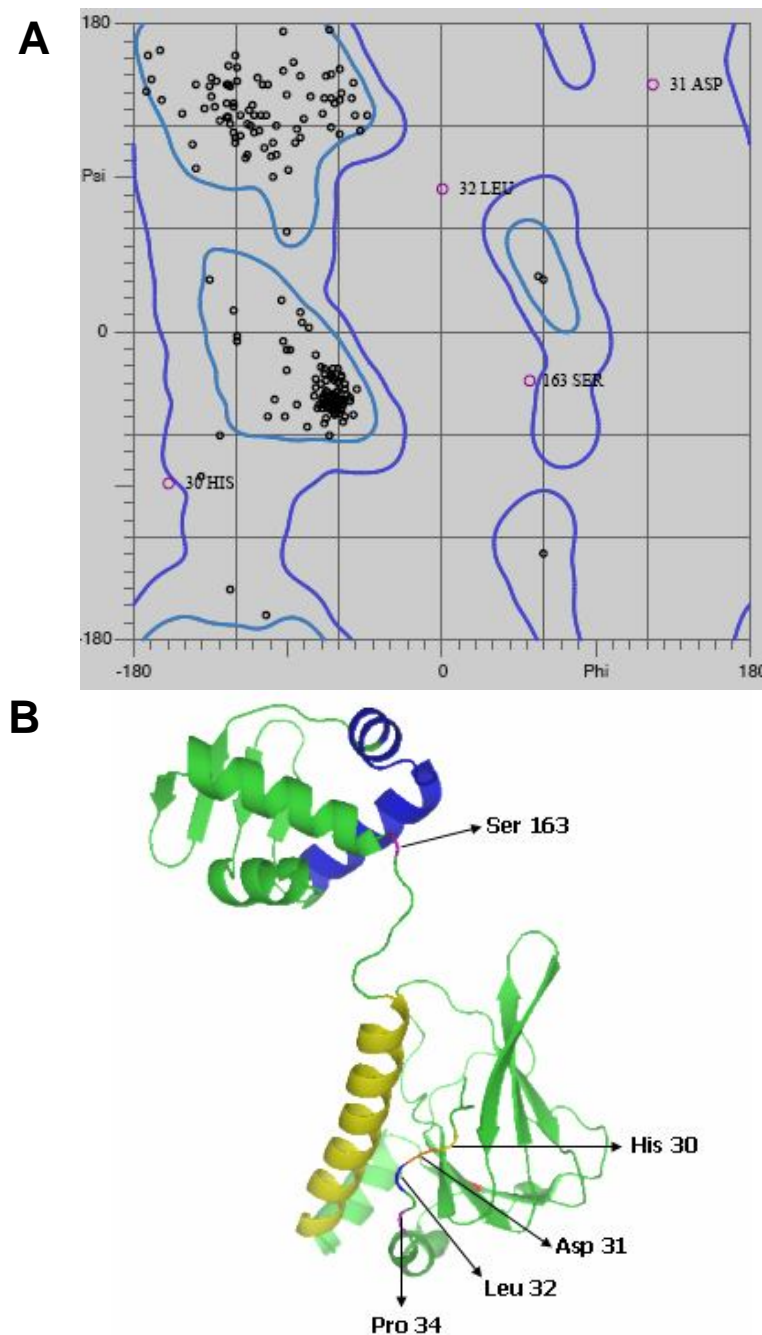


Figura 19 – Análise da qualidade do modelo estrutural da proteína FNR2 de *H.seropedicae*. Em A encontra-se o gráfico de Ramachandran, onde as regiões demarcadas em azul claro mostram as áreas de ângulos de torção favoráveis, e as demarcadas em azul escuro mostram as áreas de ângulos de torção permitidas. Os aminoácidos estão representados por círculos amarelos ou brancos delimitados por rosa. Em B encontra-se a estrutura da proteína FNR2 de *H.seropedicae* com os aminoácidos, que foram plotados em regiões desfavoráveis do gráfico, destacados.

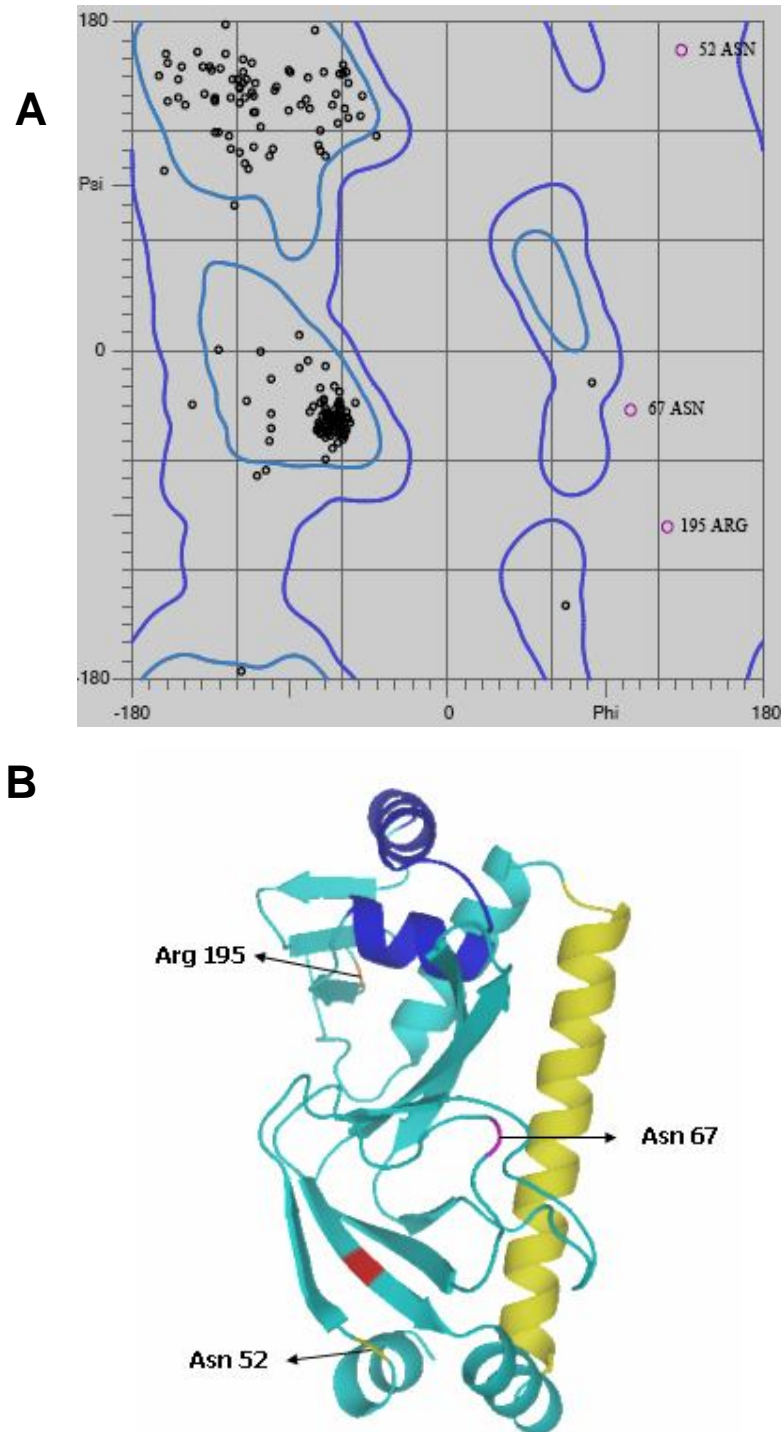


Figura 20 – Análise da qualidade do modelo estrutural da proteína FNR3 de *H.seropedicae*. Em A encontra-se o gráfico de Ramachandran, onde as regiões demarcadas em azul claro mostram as áreas de ângulos de torção favoráveis, e as demarcadas em azul escuro mostram as áreas de ângulos de torção permitidas. Os aminoácidos estão representados por círculos amarelos ou brancos delimitados por rosa. Em B encontra-se a estrutura da proteína FNR3 de *H.seropedicae* com os aminoácidos, que foram plotados em regiões desfavoráveis do gráfico, destacados.

A análise do gráfico de Ramachandran (Figuras 18-A, 19-A e 20-A) feito para avaliar os ângulos de torção Φ e ψ das estruturas tridimensionais das proteínas FNR₁, FNR₂ e FNR₃ de *H.seropedicae*, demonstra que nas três proteínas, tais ângulos encontram-se, em mais de 90% dos casos, em regiões favoráveis do gráfico de Ramachandran. Para a proteína FNR₁, 93,8% (198/211) de todos os resíduos de aminoácidos estão localizados em regiões favoráveis do gráfico, e há apenas 2 aminoácidos em regiões desfavoráveis, sendo estes os resíduos de Gln (103) e His (104). Na proteína FNR₂, 94,4% (203/215) de todos os resíduos de aminoácidos estão localizados em regiões favoráveis do gráfico, e há apenas 5 aminoácidos em regiões desfavoráveis, sendo estes os resíduos de His (30), Asp (31), Leu (32), Pro (34) e Ser (163). Por último, na proteína FNR₃, 93,9% (184/196) de todos os resíduos de aminoácidos estão localizados em regiões favoráveis do gráfico, e há apenas 3 aminoácidos em regiões desfavoráveis, sendo estes os resíduos de Asn (52), Asn (67) e Arg (195).

Nas figuras 18-B, 19-B e 20-B percebe-se que os aminoácidos com ângulos de torção desfavoráveis encontram-se em regiões bastante móveis das respectivas estruturas tridimensionais, como por exemplo em alças e na região N-terminal. No caso da proteína FNR₂, os resíduos His (30), Asp (31), Leu (32), Pro (34), estão localizados na região N-terminal próximo a região da proteína que contém os resíduos de cisteína, que forma o grupamento Fe-S. Considerando-se que não há nenhum grupamento Fe-S caracterizado em termos de estrutura tridimensional, pode-se inferir que esses aminoácidos não tenham sido corretamente modelados devido a essa dificuldade de manutenção de grupamento nas prováveis condições de cristalização das proteínas homólogas a FNR.

4.4 CLONAGEM DOS GENES *fnr1*, *fnr2* e *fnr3* de *Herbaspirillum seropedicae*

Para a clonagem, a região codificadora dos genes *fnr1*, *fnr2* e *fnr3* de *H. seropedicae* foram amplificados por PCR, a partir do DNA genômico da estirpe SmR1, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores citados no item 3.11. Os produtos de amplificação possuíam entre 500 e 750 pb (Figura 21).

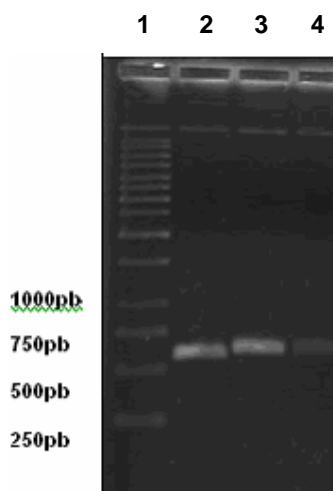


Figura 21 – Perfil eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, dos produtos de amplificação dos genes *fnr* de *H. seropedicae*. Na linha 1 observa-se o marcador de corrida de 1Kb (FERMENTAS), nas linhas 2, 3 e 4 os genes *fnr1*, *fnr2* e *fnr3* de *H. seropedicae* respectivamente.

Os produtos de PCR dos genes *fnr1*, *fnr2* e *fnr3* foram clonados no vetor pGEM®-T easy (PROMEGA) (Figura 22) e também no vetor pCR2.1 (INVITROGEN) (Figura 23). A confirmação da clonagem, em ambos os vetores, foi feita através do perfil de restrição com a enzima EcoR I (Figuras 24 e 25) e sequenciamento de DNA. Os plasmídeos recombinantes gerados da ligação dos genes *fnr1*, *fnr2* e *fnr3* amplificados ao vetor pGEM®-T easy (PROMEGA) foram chamados respectivamente de pMBB1, pMBB2 e pMBB3, já os plasmídeos recombinantes gerados da ligação dos amplificados ao vetor pCR2.1 (INVITROGEN) foram chamados respectivamente de pMBB4, pMBB5 e pMBB6.

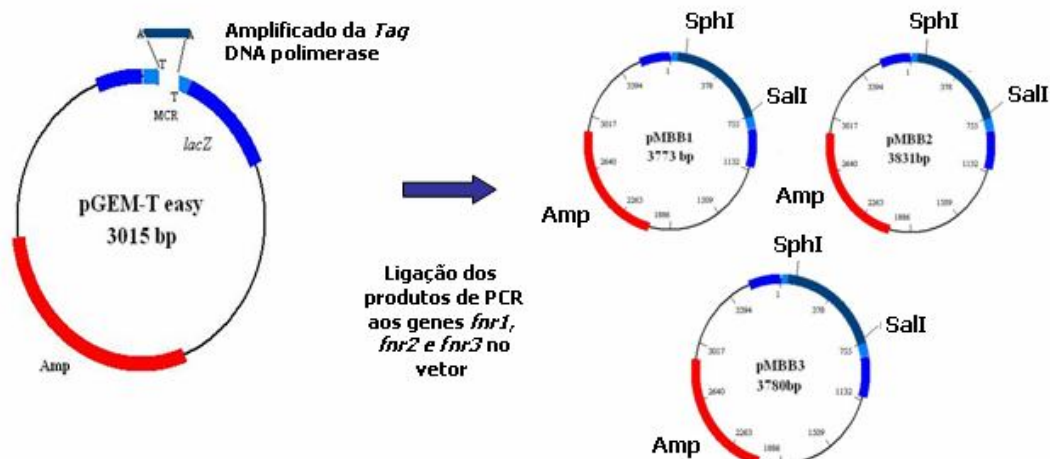


Figura 22 – Esquema de clonagem dos genes *fnr* de *H. seropedicae* no vetor pGEM-T easy. Os produtos de amplificação foram ligados ao vetor para a construção dos plasmídeos pMBB1, pMBB2 e pMBB3.

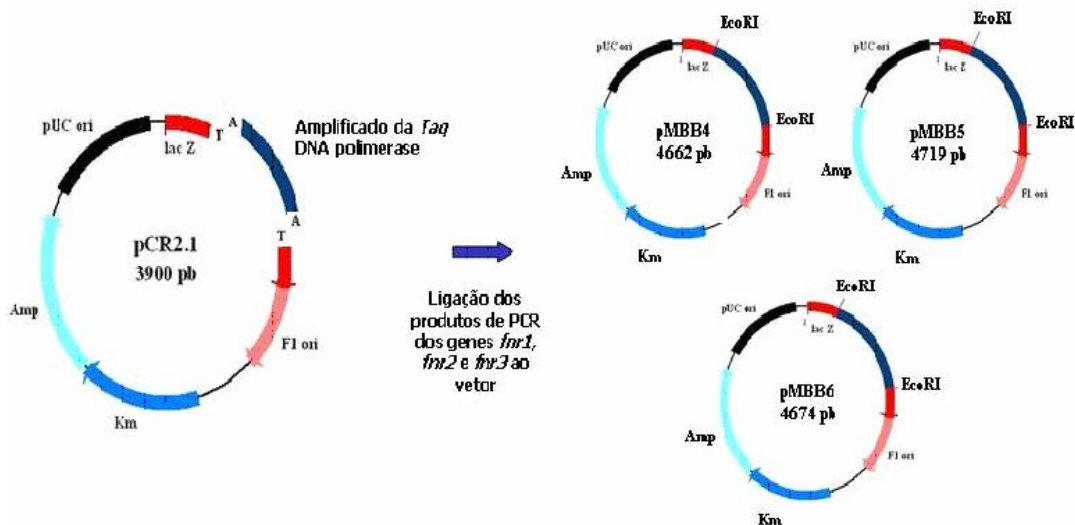


Figura 23 – Esquema de clonagem dos genes *fnr* de *H. seropedicae* no vetor pCR2.1. Os produtos de amplificação foram ligados ao vetor para a construção dos plasmídeos pMBB4, pMBB5 e pMBB6.

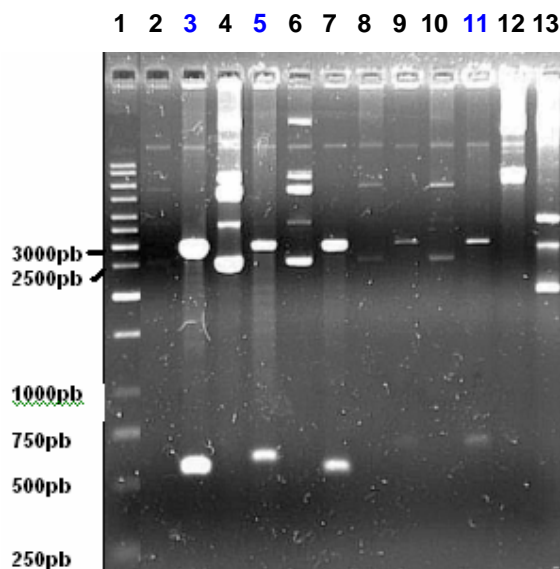


Figura 24 – Perfil de restrição dos plasmídeos pMBB1, pMBB2 e pMBB3 com a enzima *EcoRI*. Na linha 1 observa-se o marcador de corrida de 1Kb (FERMENTAS), nas linhas 2,4,6,8,10 e 12 estão, respectivamente, os plasmídeos pMBB1A pMBB1B, pMBB2A, pMBB2B, pMBB3A e pMBB3B purificados. Nas linhas 3,5,7,9,11 e 13 estão estes plasmídeos digeridos com a enzima *EcoRI*. Nas linhas destacadas em azul encontram-se os plasmídeos em que houve liberação dos fragmentos *fnr* entre 500 e 750 pb confirmando a clonagem. A confirmação também foi feita através de seqüenciamento de DNA.

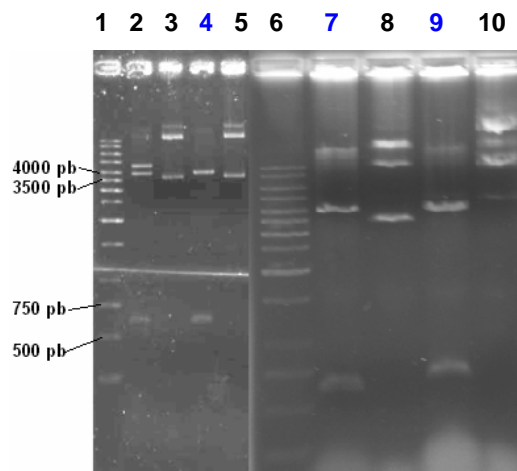


Figura 25 – Análise de restrição dos plasmídeos pMBB4, pMBB5 e pMBB6 com a enzima *EcoRI*. Nas linhas 1 e 6 observa-se o marcador de corrida de 1Kb (FERMENTAS), nas linhas 3,5,8 e 10 estão, respectivamente, os plasmídeos pMBB4a, pMBB4b, pMBB5 e pMBB6 purificados. Nas linhas 2,4,7 e 9 estão estes plasmídeos digeridos com a enzima *EcoRI*. Nas linhas destacadas em azul estão os plasmídeos em que houve liberação dos fragmentos *fnr* entre 500 e 750 pb confirmando a clonagem. A confirmação também foi feita através de seqüenciamento de DNA.

Após a confirmação da clonagem, os plasmídeos pMBB1, pMBB2 e pMBB3 foram utilizados para a subclonagem dos fragmentos do genes *fnr* no vetor pSUP202 (SIMON, PRIEFFER e PUHLER, 1983). A subclonagem foi feita digerindo-se os plasmídeos pMBB1, pMBB2, pMBB3 e também o vetor pSUP202 com as enzimas SphI e Sall (Figura 26 e 27). No vetor pSUP202 (SIMON, PRIEFFER e PUHLER, 1983) estas enzimas estão no sítio que confere resistência ao antibiótico tetraciclina.

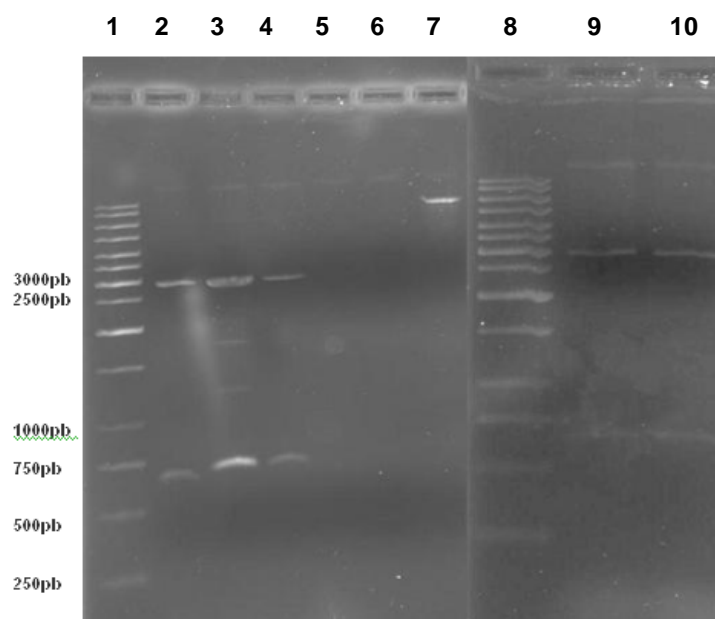


Figura 26 – Preparo dos plasmídeos para subclonagem. Os plasmídeos pMBB1, pMBB2a pMBB2b, pMBB3a e pMBB3b e o vetor pSUP202 foram digeridos com as enzimas SphI e Sall. Nas linhas 1 e 8 observa-se o marcador de corrida de 1Kb (FERMENTAS), nas linhas 2,3 e 4 estão os plasmídeos pMBB1, pMBB2a e pMBB2b digeridos com SphI e Sall respectivamente. Nas linhas 7, 9 e 10 estão os plasmídeos pSUP202, pMBB3a e pMBB3b também digeridos com SphI e Sall, respectivamente.

Os produtos de digestão foram então ligados conforme item 3.7 e os plasmídeos recombinantes obtidos (Figura 27), denominados respectivamente de pSUPfnr1, pSUPfnr2 e pSUPfnr3, foram transferidos para a estirpe TOP10 de *E. coli*, por eletroporação, conforme item 3.8. A confirmação da clonagem foi feita através de análise da perda de resistência ao antibiótico tetraciclina (10µg/mL) e também por padrão de restrição utilizando-se as enzimas SphI e Sall (Figura 28).

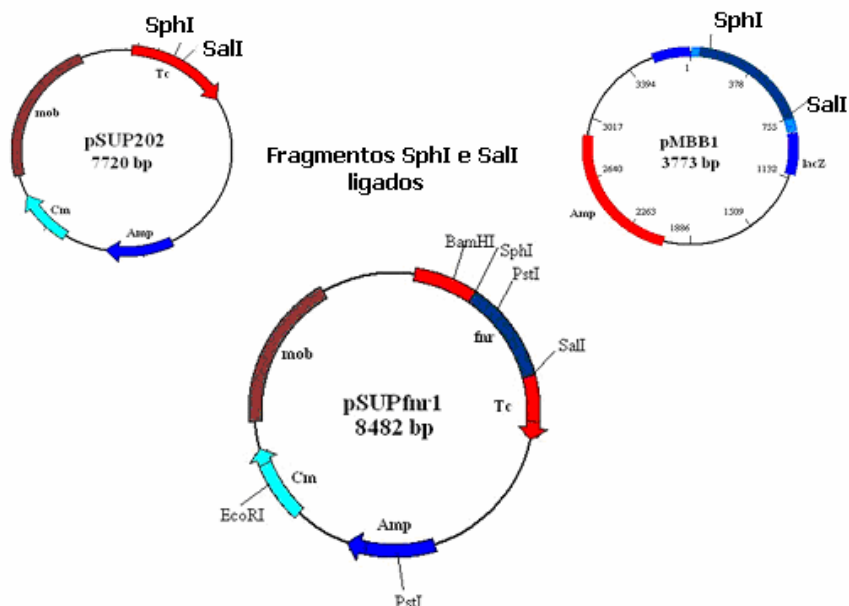


Figura 27 – Esquema de subclonagem dos genes *fnr* de *H. seropedicae* no vetor pSUP202, para obtenção dos plasmídeos pSUPfnr.

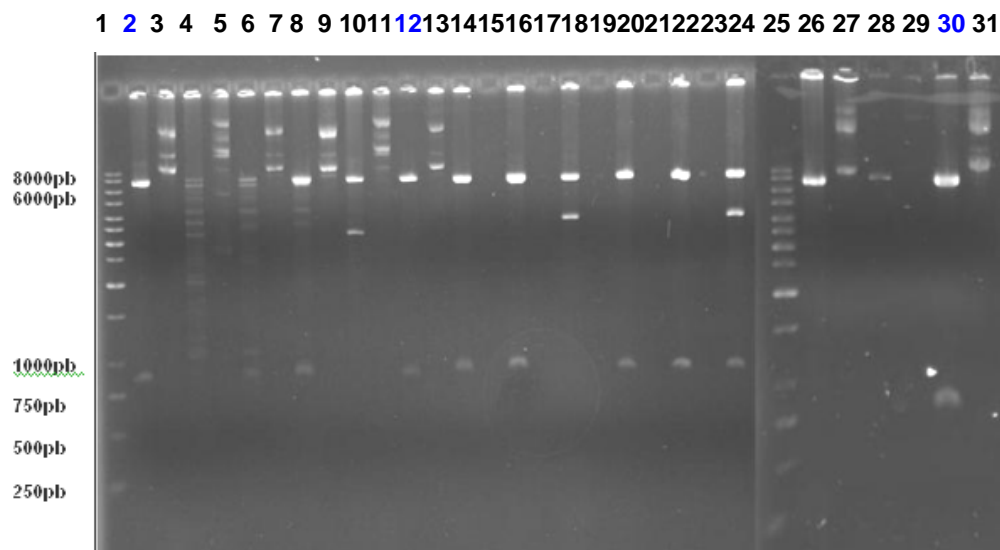


Figura 28 – Padrão de restrição dos plasmídeos pSUPfnr1, pSUPfnr2 e pSUPfnr3 com as enzimas SphI e SalI. Nas linhas 1 e 25 observa-se o marcador de corrida de 1Kb (FERMENTAS). Nas linhas destacadas em azul estão os clones corretos, ou seja, que tiveram como padrão de restrição a liberação do fragmento do gene *fnr* entre 500 e 750 pb e do fragmento correspondente ao vetor pSUP202 em um tamanho entre 6000 e 8000 pb. Nas linhas 2, 12, 14, 16, 20, 22 e 30 estão respectivamente os plasmídeos pSUPfnr1A, pSUPfnr1F, pSUPfnr2A, pSUPfnr2B, pSUPfnr2D, pSUPfnr2E e pSUPfnr3C cortados com as enzimas SphI e SalI.

4.5 INSERÇÃO DO CASSETE DE CANAMICINA NOS GENES *fnr1*, *fnr2* e *fnr3* DE *Herbaspirillum seropedicae*

Para inserção do cassete de canamicina nos genes *fnr1* e *fnr3*, os plasmídeos pSUPfnr1 e pSUPfnr3 foram parcialmente digeridos com a enzima PstI e ligados ao fragmento PstI do plasmídeo pUC4K, que confere resistência à canamicina. Estes plasmídeos foram chamados respectivamente de pSUPfnr1km e pSUPfnr3km.

Já para a inserção do cassete no gene *fnr2*, o plasmídeo pSUPfnr2 foi digerido com a enzima BglII e ligado ao fragmento BamHI do plasmídeo pUC4K, que confere resistência à canamicina. Este plasmídeo foi denominado pSUPfnr2km (Figura 29).

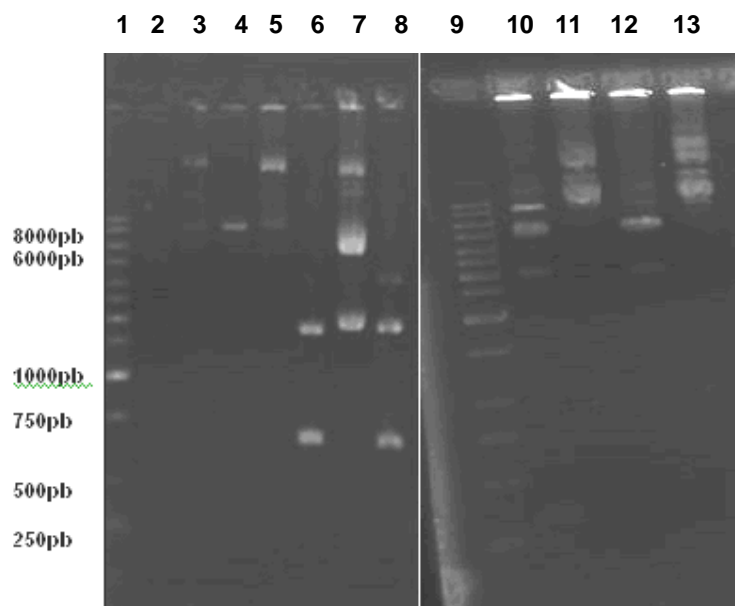


Figura 29 – Preparo dos vetores para inserção do cassete de canamicina. Nas linhas 1 e 9 observa-se o marcador de corrida de 1Kb (FERMENTAS). Nas linhas 4, 6, 8, 10 e 12 estão, respectivamente, os plasmídeos pSUPfnr2A digerido com BglII, pUC4K digerido com BamHI, pUC4K digerido com PstI, pSUPfnr1A digerido com PstI e o pSUPfnr3C digerido com PstI. Nas linhas 3,5,7,11 e 13 estão, respectivamente, os plasmídeos pSUPfnr2A, pUC4K pSUPfnr1A e o pSUPfnr3C purificados.

Após a ligação e transformação dos plasmídeos recombinantes obtidos, a clonagem foi confirmada através de análise de restrição com a enzima PstI

(Figura 30), e também através de amplificação por PCR (Figura 32). Nestas análises verificou-se, respectivamente, a liberação de três fragmentos de restrição e a obtenção de um produto de PCR de aproximadamente 2000pb correspondente a somatória do número de pares de bases dos genes *fnr* e do cassete de canamicina.

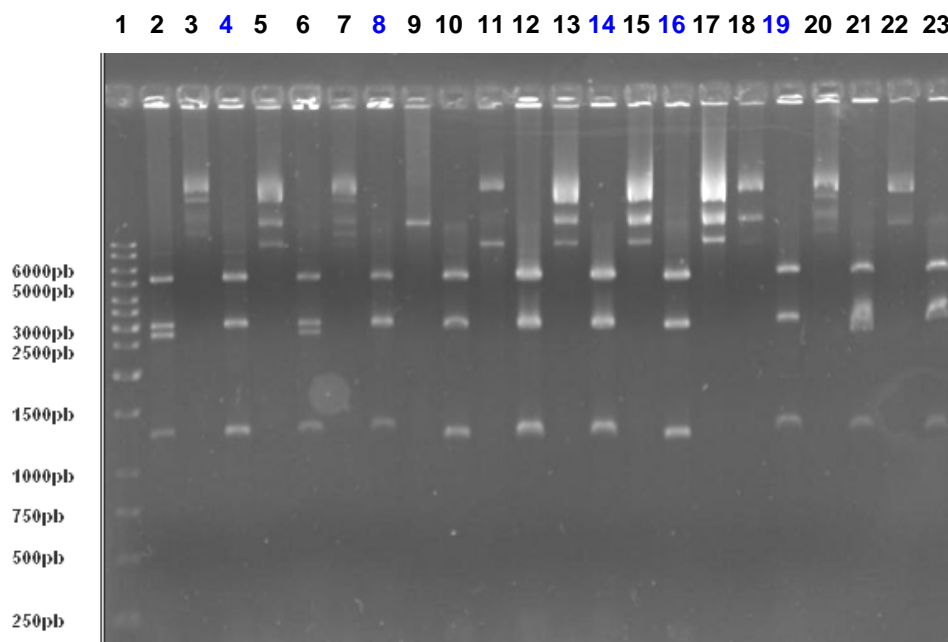


Figura 30 – Perfil de restrição com a enzima PstI para confirmação da entrada do cassete de canamicina nos genes *fnr*. Na linha 1 está o marcador de corrida de 1Kb (FERMENTAS). Nas linhas 2, 4, 6 e 8 estão os plasmídeos pSUPfnr1KmA, pSUPfnr1KmB, pSUPfnr1KmC, pSUPfnr1KmD, digeridos com PstI, já nas linhas 3,5,7 e 9 estão os respectivos plasmídeos purificados. Nas linhas 10, 12, 14 e 16 estão os plasmídeos pSUPfnr2KmA, pSUPfnr2KmB, pSUPfnr2KmC e pSUPfnr2KmD digeridos com PstI, já nas linhas 11, 13, 15 e 17 estão os respectivos plasmídeos purificados. Nas linhas 19, 21 e 23 observam-se os plasmídeos pSUPfnr3KmA, pSUPfnr3KmB e pSUPfnr3KmC digeridos com PstI, nas canaletas 18, 20 e 22 são mostrados os respectivos plasmídeos purificados.

Na Figura 30, as linhas em azul mostram as três bandas esperadas da digestão dos plasmídeos com a enzima PstI. Uma das bandas tem um tamanho entre 1000 e 1500 pb correspondente ao cassete de canamicina. As outras duas correspondem a dois fragmentos contendo parte do vetor pSUP202 mais parte do gene *fnr*, correspondendo a tamanhos entre 3000 e

4000 pb e entre 5000 e 7000 pb respectivamente. Esta análise de restrição sugeriu que o cassete de canamicina estivesse corretamente inserido dentro dos genes *fnr1*, *fnr2* e *fnr3*, porém uma amplificação dos genes a partir de plasmídeos purificados, utilizando os *primers fnr* (Item 3.11) também foi feita para confirmação da entrada do cassete de canamicina nos genes (Figura 31).

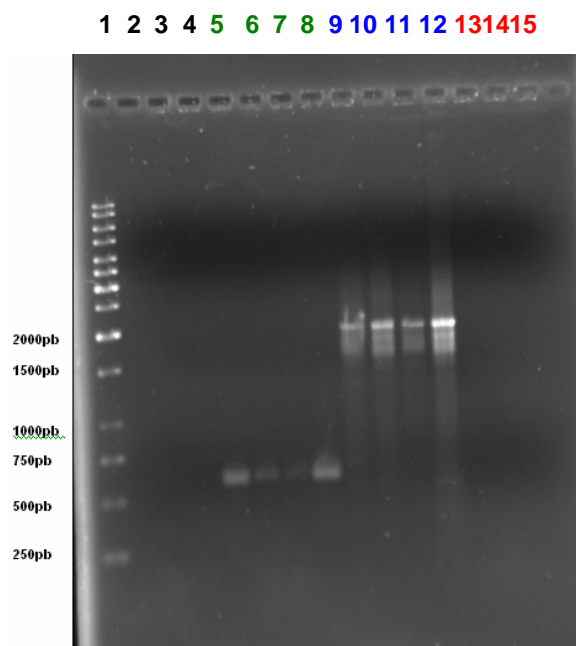


Figura 31 – Amplificação dos genes *fnr* por PCR para confirmação da entrada do cassete de canamicina nos genes *fnr*. Na linha 1 observa-se o marcador de corrida de 1Kb (FERMENTAS), linhas 2,3 e 4 estão os controles negativos das reações. Nas linhas 5,6,7 e 8 estão os produtos de amplificação dos plasmídeos pSUPfnr1Km (A,B,C e D), nas linhas 9,10,11 e 12 os produtos de amplificação dos plasmídeos pSUPfnr2Km (A,B,C e D) e nas linhas 13,14 e 15 os produtos dos plasmídeos pSUPfnr3Km (A,B e C).

Na figura 31, as linhas em azul mostram um amplificado entre 1500 e 2000pb que corresponde ao gene *fnr2* mais o cassete de canamicina. Nas linhas em verde o fragmento possuía cerca de 750 pb correspondente ao gene *fnr1* sem o cassete inserido. Nas linhas em vermelho não foi visualizado nenhum fragmento, possivelmente porque não ocorreu amplificação, já que durante a clonagem do gene *fnr3* a região de hibridização do primer foi perdida.

Segundo a figura 31, somente o plasmídeo pSUPfnr2KmA possui o cassete de canamicina inserido na região codificadora do gene *fnr2*. Sendo

assim este plasmídeo foi transferido para a estirpe S.17 de *E.coli*, por eletroporação para posterior transferência para *H. seropedicae* por conjugação, visando-se obter mutantes por recombinação homóloga.

Na Figura 31, as linhas em verde, mostram que os fragmentos amplificados possuíam um tamanho entre 500 e 750 pb correspondente ao gene *fnr1* sem o cassete inserido. Sendo assim novos plasmídeos provenientes da reação de ligação do cassete de canamicina a região codificadora do gene *fnr1* de *H. seropedicae* foram analisados, através de restrição com as enzimas BamHI e Sall (Figura 32).

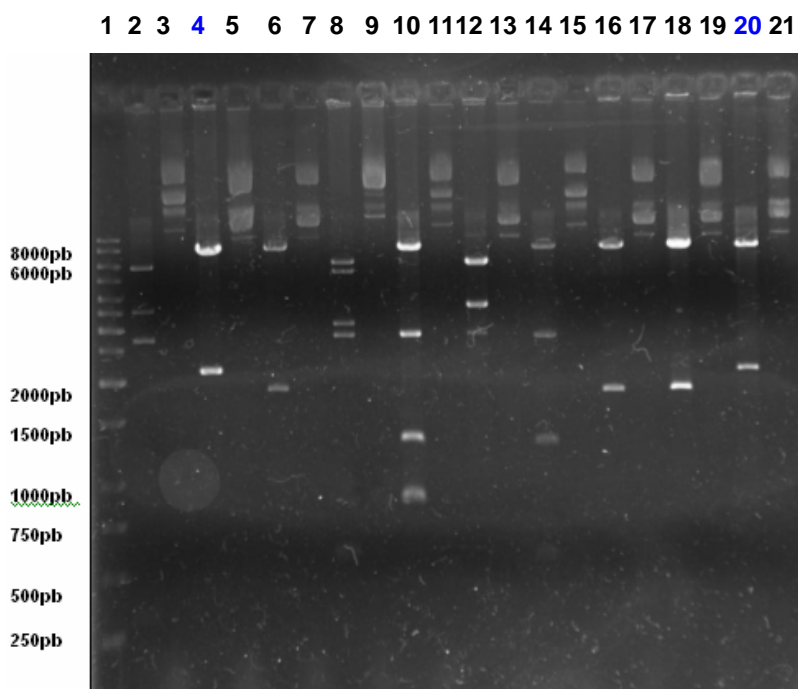


Figura 32 – Padrão de restrição de plasmídeos pSUPfnr1Km com as enzimas BamHI e Sall. Na linha 1 observa-se o marcador de corrida de 1Kb (FERMENTAS). Nas linhas 2,4,6,8,10,12,14,16,18 e 20 estão os plasmídeos pSUPfnr1Km (E,F,G,H,I,L,M,N,O,P) digeridos com *BamHI* e *Sall*, já nas linhas 3,5,7,9,11,13,15,17,19 e 21 estão os respectivos plasmídeos purificados.

O padrão de restrição da figura 32 (linhas em azul) indica que ocorreu a inserção do cassete de canamicina no gene *fnr1*. Para confirmação deste resultado, o plasmídeo pSUPfnr1KmF, foi digerido com as enzimas e/ou pares de enzimas BamHI, Sall, PstI/Sall e BamHI/Sall, de acordo com mapa de restrição da figura 33.

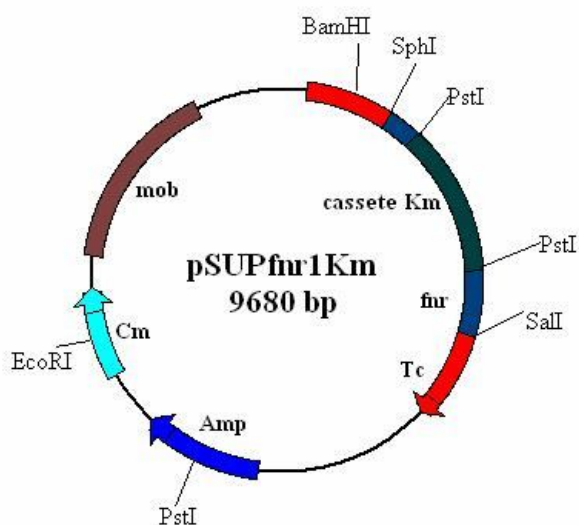


Figura 33 – Mapa de restrição do plasmídeo pSUPfmr1KmF.

A figura 34 mostra o resultado desta restrição, onde foi possível verificar que os fragmentos obtidos correspondem ao mapa de restrição teórico deste plasmídeo (Figura 33), confirmando, deste modo, a inserção do cassete de canamicina na região codificadora do gene *fmr1* de *H.seropedicae*.

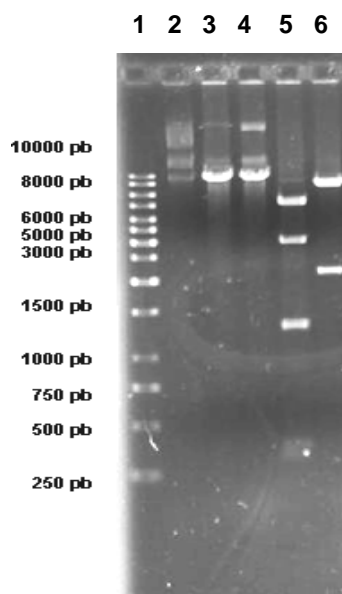


Figura 34 – Análise de restrição do plasmídeo pSUPfmr1KmF para confirmação da entrada do cassete de canamicina no gene *fmr1*. Na linha 1 observa-se o marcador de corrida de 1Kb (FERMENTAS), na linha 2 encontra-se o plasmídeo pSUPfmr1KmF purificado e nas linhas 3,4,5 e 6 encontram-se os produtos da restrição com as enzimas e/ou pares de enzimas BamHI, SalI, PstI/SalI e BamHI/SalI.

4.6 CONSTRUÇÃO DOS MUTANTES CROMOSSOMAIS DE *Herbaspirillum seropedicae* (SmR1) NOS GENES *fnr1* E *fnr2*.

Para a construção dos mutantes, os plasmídeos pSUPfnr1KmF e pSUPfnr2KmA foram transferidos, por eletroporação (Item 3.8), para estirpe S17.1 de *Escherichia coli* (tra⁺). Esta estirpe de *E. coli*, foi então utilizada para a conjugação com o *H. seropedicae* (SmR1), como descrito no item 3.9, para a obtenção de possíveis mutantes gerados por recombinação homóloga. Colônias transconjugantes foram isoladas em placas de NFb-malato suplementadas com 20mmol/L de NH₄Cl, como fonte de nitrogênio, e também com os antibióticos estreptomicina (80µg/mL), ácido nalidíxico (5 µg/mL) e canamicina (500µg/mL), para seleção. Após o isolamento, dez colônias de possíveis mutantes nos genes *fnr1* e *fnr2* foram selecionadas para análise da ocorrência da recombinação homóloga. Esta análise foi realizada através de reação de amplificação por PCR apresentada nas Figuras 35 e 36, utilizando-se o DNA cromossomal obtido de culturas saturadas crescidas em meio líquido, posteriormente fervidas.

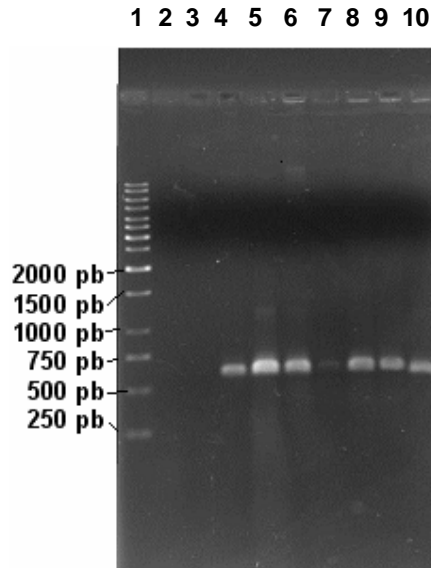


Figura 35 – Amplificação dos genes *fnr1* por PCR, a partir de DNA cromossomal, para verificação de recombinação homóloga. Na linha 1 observa-se o marcador de corrida de 1Kb (FERMENTAS). Nas linhas 2,3 estão os controles negativos da reação. Nas linhas de 4 a 10 estão os produtos de amplificação do DNA cromossomal das possíveis estirpes mutantes no gene *fnr1*.

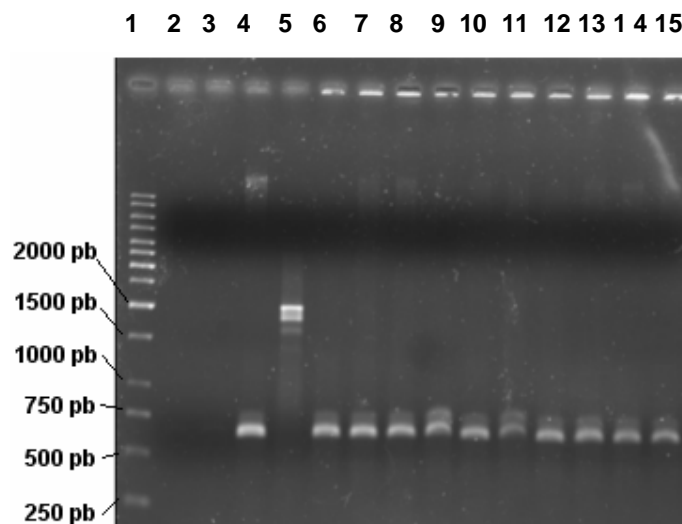


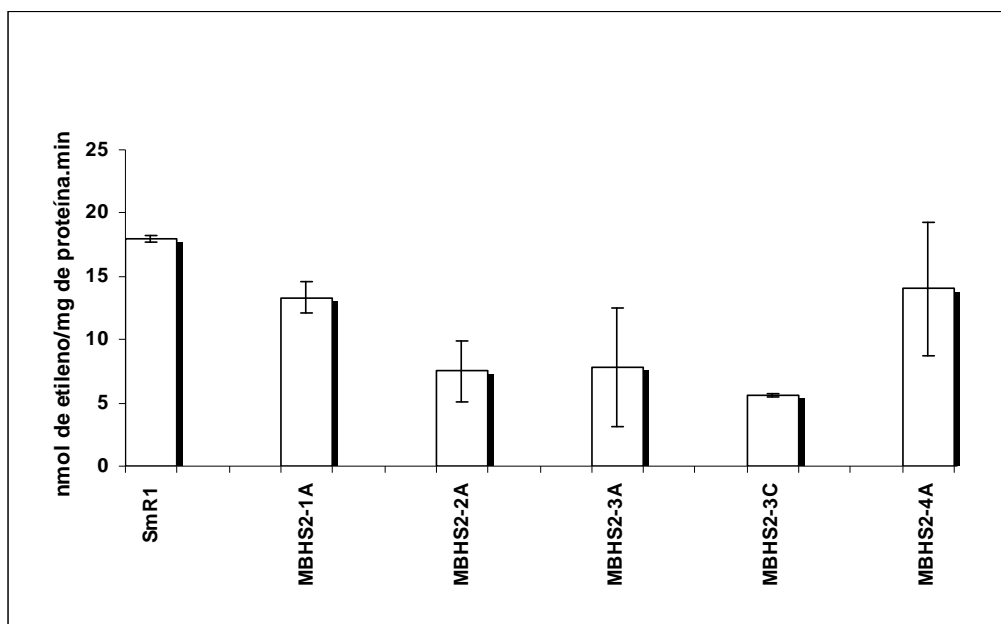
Figura 36 – Amplificação dos genes *fnr2* por PCR, a partir de DNA cromossomal, para verificação de recombinação homóloga Na linha 1 observa-se o marcador de corrida de 1Kb (FERMENTAS). Nas linhas 2,3 e 4 estão os controles negativos das reações, utilizando-se como molde, H₂O, o vetor pSUP202 purificado, e o DNA cromossomal da estirpe selvagem (SmR1), respectivamente. Na linha 5 encontra-se o controle positivo para ocorrência de recombinação dupla. Nas linhas de 6 a 15 estão os produtos de amplificação do DNA cromossomal das possíveis estirpes mutantes no gene *fnr2*.

O resultado das reações de amplificação apresentadas nas figuras 35 e 36 juntamente com o isolamento das estirpes resistentes a canamicina nas concentrações de 500 µg/mL e 1000 µg/mL, sugerem a presença de mutantes, gerados por recombinação homóloga simples.

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE NITROGENASE DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. seropedicae* NO GENE *fnr2*.

Tendo a confirmação da obtenção dos mutantes nos genes *fnr1* e *fnr2*, foi então feita a determinação da atividade do complexo enzimático da nitrogenase nos mutantes *fnr2* obtidos. Foram realizados ensaios independentes em triplicata para cada estirpe mutante obtida e também para a estirpe selvagem (SmR1), como descrito no Item 3.12. A atividade da nitrogenase para as estirpes mutantes no gene *fnr2* e selvagem de *Herbaspirillum seropedicae* está apresentada na figura 37.

Figura 37 – Gráfico de atividade da nitrogenase nas estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* mutantes no gene *fnr2*.



A atividade de nitrogenase foi expressa como nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína da cultura. No gráfico estão indicados os desvios padrão de dois experimentos independentes realizados.

A análise da atividade de nitrogenase demonstrada no gráfico mostra que todas as estirpes mutantes obtidas analisadas tiveram uma atividade de nitrogenase menor em relação a estirpe selvagem (SmR1). A comparação entre as médias de atividade obtidas, foi feita através da aplicação do Teste t ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 10).

Tabela 10 – Comparação das médias de atividade de nitrogenase nas estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* mutantes no gene *fnr2*, utilizando-se o Teste t.

Estirpe	Média da atividade de N ₂ ase	Teste t
SmR1	17.990	a
MBHS2-1A	13350	a b
MBHS2-2A	7810	b c
MBHS2-3C	7860	b c
MBHS2-3C	5600	c
MBHS2-4A	14050	a b

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

A análise dos dados apresentados no gráfico 1 e na tabela 10 indicam que nas estirpes MBHS2-2A, MBHS2-3A e MBHS2-3C houve uma diminuição significativa entre as médias de atividade quando comparadas com a estirpe SmR1. Observou-se ainda, que estas estirpes têm atividades de nitrogenase estatisticamente iguais entre si, muito embora as estirpes MBHS2-2A e MBHS2-3A tenham apresentado um desvio padrão de atividade bastante elevado, nos dois experimentos independentes realizados.

A diminuição das atividades de nitrogenase das estirpes mutantes MBHS2-1A e MBHS2- 4A, revelaram não ter diferença estatística em relação a estirpe selvagem SmR1. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de as estirpes mutantes, como já discutido anteriormente, terem sido obtidas por recombinação homóloga simples. Nestes tipos de mutantes, pode ocorrer a restauração parcial ou total do fenótipo selvagem, o que explicaria a falta de diferença estatística na atividade de nitrogenase nestas estirpes, em relação à estirpe selvagem.

Estes resultados, em conformidade com os apresentados por Raeder 2003, sugerem que o gene *fnr2* esteja envolvido na regulação da fixação biológica de nitrogênio em *H. seropedicae*. Monteiro *et al* (2003) sugeriram que a proteína FNR, um regulador transcricional responsável pela mudança do metabolismo aeróbico para o anaeróbico, pode estar relacionada com a

sensibilidade da NifA N-truncada ao oxigênio. A ausência do gene *fnr* de *Escherichia coli* leva ao aumento da susceptibilidade da NifA N-truncada de *H. seropedicae* a degradação, possivelmente por proteólise. Em 1999, Souza e colaboradores demonstraram que a proteína NifA precisa de ferro, e em 2003, Monteiro e colaboradores demonstraram que na ausência de ferro a NifA é degradada. Considerando-se que a proteína FNR é um ativador transcricional sensível ao oxigênio que depende de ferro para atividade, pode-se sugerir que FNR ative transcionalmente um gene que codifique pra alguma proteína que ative ou participe de uma possível via de degradação da proteína NifA. Ainda há uma outra vertente que acredita que a proteína FNR possa participar da ativação transcricional de uma proteína, ou de um complexo de proteínas, que participe da formação do possível grupamento Fe-S da proteína NifA.

Em *Herbaspirillum seropedicae*, β -proteobactéria, o sistema de dois componentes NifL-NifA em que NifL dá o sinal dos níveis de oxigênio para NifA, não está presente, reforçando a hipótese de que o motivo de quatro cisteínas da NifA, esteja diretamente envolvido na resposta ao oxigênio.

Sendo assim, pode-se sugerir que a proteína FNR₂ de *H. seropedicae* tenha uma participação em uma segunda via regulatória, uma via de degradação da NifA ou de formação do grupamento Fe-S. A resposta da própria NifA ao oxigênio, pode estar relacionada com o controle de sua ativação transcricional. Em contrapartida, considerando o envolvimento da proteína FNR, em diversos organismos, com a regulação de um grande de genes em resposta ao oxigênio, estas inferências tornam-se muito frágeis, revelando a necessidade de novas análises experimentais para que novas sugestões acerca da participação da proteína FNR₂ no metabolismo do nitrogênio em *H. seropedicae* possam ser feitas.

Raeder 2003 sugeriu a presença de um promotor σ^{54} na região do gene *fnr2* de *H. seropedicae*. Novas análises desta região promotora feitas neste trabalho (Figura 38), revelaram além da presença de um possível promotor σ^{54} (ainda que este seja diferente do proposto por Raeder em 2003), uma possível UAS (*upstream activator sequence*) para a proteína NifA, corroborando a hipótese do possível envolvimento deste gene na fixação biológica de nitrogênio em *Herbaspirillum seropedicae*.

1	CCG	GGA	GAA	TAT	CGC	AAG	AAG	GAG	AAC	GCT	CCC	CGT	CCC	GCT	CCG	45
46	ATC	GTT	TCG	GTT	GGC	TCC	CCT	CTT	CAG	GTC	CAC	AGA	TCA	TGA	AAA	90
91	TCG	CAC	CGT	TCT	TCC	GCT	TCT	ATC	ATT	TCT	ACC	GGC	GCA	GCG	GCA	135
NifA UAS																
136	ATT	CCA	TGC	GCC	TGT	CTG	CGC	GCC	TGG	CAT	GGA	ACA	AGA	TCC	TCA	180
181	GCA	GCT	ATT	ACT	GAT	TGC	TGA	ATT	GTT	AGG	AAA	GGC	AGT	CCG	CTT	225
226	TTC	AGT	CCA	CCG	CTG	TCC	CGC	CAC	GGT	CCT	TTG	CGC	AAG	CTC	ATC	270
Promotor σ^{54}																
271	CAG	GCG	GTG	AGA	GTT	AGT	GTG	CAT	TCA	CTG	CCA	TGT	TCC	ACA	ATT	315
316	GAC	CTA	GAT	CAG	TTC	GGC	TGC	CTG	CGC	GTT	TTC	CCA	GGG	CCT	GCA	360
361	TGC	TTT	CAC	TAT	CTT	TAA	AGA	AGG	CCC	TGC	GGT	TCG	CAC	AAA	AAC	405
406	ACG	TGC	CCG	ATG	CTT	TCT	TGA	AGC	CCT	GCC	CTT	GCC	GGC	AGA	CAA	450
451	TGA	CAC	GAA	CTT	CGC	GCT	GTG	CTA	ACA	CCT	CGG	GGG	CCT	GGA	GCC	495
496	GCT	ATG	AGC	AAG	TCC	GAC	AAT	GAC	CTG	AGT	AAG	CGT	TTG	TTT	CCC	540
1	M	S	K	S	D	N	D	L	S	K	R	L	F	P		14
541	GTC	TTG	ACA	TGC	CGA	AAC	TGC	ATC	GTC	AAG	AAA	CAC	TGC	TTT	CCT	585
15	V	L	T	C	R	N	C	I	V	K	K	H	C	F	P	30
586	CAC	GAC	CTC	AGC	CCC	GAG	GAA	ACG	GCA	CAG	TTC	GAG	CAG	CTG	GTC	630
31	H	D	L	S	P	E	E	T	A	Q	F	E	Q	L	V	46

Consenso do Promotor σ^{54} CTGGCA-N₁₀-TTGCA

Provável Promotor σ^{54} CTGCCA-N₁₀-TTGAC

Consenso NifA UAS TGT-N₁₀-ACA

Provável NifA UAS TGT-N₁₀-GCA

Figura 38 – Região promotora do gene *fmr2* de *Herbaspirillum seropedicae*. A provável UAS (*upstream activator sequence*) da proteína NifA está destacada em preto e negrito, o provável promotor σ^{54} em laranja e negrito, o provável sítio de ligação do ribossomo em marrom e negrito e a região inicial dos nucleotídeos codificadores, acompanhados dos respectivos aminoácidos codificados, destacada em azul e negrito.

5 CONCLUSÕES

- A região do gene *fnr1* de *H.seropedicae* tem uma organização bastante semelhante a dos seus homólogos *fixK* em *Bradyrhizobium sp* e também em *Sinorhizobium meliloti*. Este padrão corresponde ao descrito por KÖRNER, SOFIA e ZUMFT, 2003. Pode-se sugerir que *fnr1* possa realizar um mecanismo de regulação dos genes *fix* de *H.seropedicae*, assim como nos rizóbios citados;
- A existência do provável operon *fnr3hs236.206hs236.0198cpdA* em *Herbaspirillum seropedicae* pode sugerir um via de regulação da degradação do cAMP, tendo em vista que o gene *cpdA* codifica para uma provável 3' 5' – cAMP fosfodiesterase;
- As análises fisiológicas dos mutantes *fnr2-* de *Herbaspirillum seropedicae*, revelaram que estes possuem uma atividade de nitrogenase diminuída em relação a estirpe selvagem (SmR1). Sendo assim, sugere – se que este gene esteja envolvido no metabolismo do nitrogênio neste organismo;
- As análises *in silico* da região promotora do gene *fnr2* sugerem a presença de um provável promotor $\sigma 54$ e de uma “*upstream activator sequence*” para a proteína NifA, corroborando a hipótese de envolvimento deste gene na FBN em *Herbaspirillum seropedicae*;
- Os modelos estruturais teóricos gerados para as três proteínas homólogas a FNR de *Herbaspirillum seropedicae*, assim como as outras análise *in silico* realizadas, corroboram a hipótese da existência de três proteínas FNR em *H.seropedicae*;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, A.; SHEIKH, S.; HUSSAIN, S.; QAMAR, I.A.; KHAN, B.R. Breeding food and forage legumes for enhancement of nitrogen fixation. **Science Vision**, v.6, p.49- 57, 2000
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFER, A . A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLEER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**,v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ARNOLD K., BORDOLI L., KOPP J., and SCHWEDE T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, 22,195-201, 2006.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **Int. J. Sys. Bact.**, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice contributions and prospects for improvement. **Plant Soil**, v. 174, p. 195-209, 1995.
- BALDANI J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 46, p. 802-810, 1996.
- BAIROCH, A *et al.* The Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic Acids Res.** 33: D138-D141, 2005.
- BATES, D.M., LAZAZZERA, B.A. and KILEY, P.J. Characterization of FNR* mutant proteins indicates two distinct mechanisms for altering oxygen regulation of the Escherichia coli transcription factor FNR. **J. Bacteriol.** 177, 3972-3978, 1995.
- BATUT, J.; BOISTARD, P. Oxygen control in *Rhizobium*. **Antonie Leeuwenhoek** 66:129–150, 1994.
- BAUER, C.E.; ELSSEN, S.; and BIRD, T.H. Mechanisms of redox control of gene expression. **Annu. Rev. Microbiol.** 53: 495–523, 1999.
- BENELLI, E. M.; BUCK, M.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G; AND PEDROSA, F.O. Uridylylation of the PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.** v. 47, p. 309-314, 2001.

BENELLI, E. M.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S., RIGO, L.U.; AND PEDROSA, F.O. Evidences for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 179, p. 4623-4626, 1997.

BENELLI, E.M., SOUZA, E.M., FUNAYAMA, S., RIGO, L.U., PEDROSA, F.O. Evidence for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.** 179, 4623–4626, 1997.

BERGER, D.K.; NARBERHAUS, F.; LEE, H.; KUSTU, S. In Vitro Studies of the Domains of the Nitrogen Fixation Regulatory NifA Protein. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 191-199, 1995.

BES MT, PARISINI E, INDA LA, SARAIVA LM, PELEATO ML, SHELDRIK GM. Crystal structure determination at 1.4 Å resolution of ferredoxin from the green alga *Chlorella fusca*. **Structure** 15;7(10):1201-11, 1999

BRILL, W.J. Biological nitrogen fixation. **Sci. American**, v.236, p.68-81, 1977.

BROWNING, D.F., BEATTY, C.M., WOLFE, A.J., COLE, J.A BUSBY, S.J. Independent regulation of the divergent *Escherichia coli* *nrfa* and *acsPI* promoters by a nucleoprotein assembly at a shared regulatory region. **Mol. Microbiol.** 43: 687-701, 2002.

BURRIS, R.H. Minireview: Nitrogenases. **J. Biol. Chem.**, v.266, p.9339-9342, 1991.

COSSART, P., GICQUEL-SANSEY., B. Cloning and sequences of the *crp* gene of *Escherichia coli* K12. **Nucl Acids Res** 10: 1363-1378, 1990.

DAVIS, I, A., LEAVER-FAY, W., CHEN, V.B., BLOCK, J.N., KAPRAL, G.J., WANG, X., MURRAY, L.W., ARENDALL III, W.B., SNOEYINK, J., RICHARDSON, J.S., AND RICHARDSON, D.C. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. **Nucleic Acids Research** 35 Web Server issue, 375-383, 2007

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 621-631, 2004.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.; REIS, V.M. The role of biological nitrogen fixation to bio-energy programmes in the tropics. **EMBRAPA**, 2000.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant-bacteria interaction: Endophytic N₂ fixing bacteria. **Cienc. Cult.**, v. 44, p. 310-313, 1992.

DOWER, W. J.; MILLER, J. F.; RAGDALE, C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 6127-6145, 1988.

DRUMMOND, M.; WHITTY, P.; WOOTTON, J. Sequence and domain relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. **EMBO J.**, v. 5, p. 441-447, 1986.

EADY, R.R.; POSTGATE, J.R. Nitrogenase. **Nature**, v.249, p.805-810, 1974.

ENGEL, P., TRAGESER, M. and UNDEN, G. Reversible interconversion of the functional state of the gene regulator FNR from *Escherichia coli* in vivo by O₂ and iron availability. **Arch. Microbiol.** 156, 463- 470,1991.

FISCHER, H. M; BRUDENER, T.; HENNECKE, H. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox activity and/or metal binding. **Nucl. Acids Res.**, v.16, p.2207-2224,1988.

FISCHER, H. Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. **Microbiol. Rev.**, v. 58, p. 152-386, 1994.

FOUSSARD, M., GARNERONE, A.-M., NI, F., SOUPÉNE, E., BOISTARD, P AND BATUT, J. Negative autoregulation of the *Rhizobium meliloti fixK* gene is indirect and requires a newly identified regulator, FixT. **Mol. Microbiol.** 25:27–37, 1997

FU, H.; BURRIS, R.H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, v.171, p.3168-3175, 1989.

GALLEGOS, M. T., SCHLEIF, R., BAIROCH, HOFMANN, K. AND RAMOS, J.L. Arac/XylS family of transcriptional regulators. **Microbiol. Mol Biol Rev.** 61(4):. 393-410, 1997.

GOVANTES, F., E. ANDUJAR, and E. SANTERO.. Mechanism of translational coupling in the *nifLA* operon of *Klebsiella pneumoniae*. **EMBO J.** 17:2368–2377, 1998.

GRABBE, R. **Regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*: The role of Fnr in oxygen signal-transduction.** 119 f. Dissertation Zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August Universität zu Göttingen, Göttingen, 2002.

GRABBE, R.; KLOPPROGGE, K.; AND SCHMITZ, R.A. Fnr is required for NifL-dependent oxygen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.** 183:1385–1393, 2001

GRABBE, R.; AND SCHMITZ, R.A. Oxygen Control of *nif* Gene Expression in *Klebsiella pneumoniae* is dependent on NifL reduction at the cytoplasmic membrane by electrons derived from the reduced quinone pool. **European journal of biochemistry** 270, 1555–1566 2003.

GREEN, J.; BENNETT, B.; JORDAN, P.; RALPH, E.T; THOMSON, A.J; AND GUEST. Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR and demonstration of the

aerobic-anaerobic transcription switch in vitro. **Biochem. J.**, v. 316, p. 887-892, 1996a.

GREEN, J.; ANJUM, M.F.; AND GUEST, J.R. The *ndh*-binding protein (Nbp) regulates the *ndh* gene of *Escherichia coli* in response to growth phase and is identical to Fis. **Mol. Microbiol.** 20: 1043–1055, 1996b.

GUEx, N., DIEMAND, A., PEITSCH, M.C. Protein modeling for all. **Trends Bioch Sci** 24(9), 364-367, 1999

GUEx, N. and PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. **Electrophoresis** 18: 2714-2723, 1997.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v. 166, p. 557-580, 1983.

HENDERSON, N., AUSTIN, S and DIXON, R.A. Role of metal ions in negative regulation of nitrogen fixation by the *nifL* gene product from *Klebsiella pneumoniae*. **Mol. Gen. Genet.** 216:484–491, 1989.

HENDRICKSON, W., FLAHERTY, C., MOLZ, L. Sequence elements in the *Escherichia coli* *araFGH* promoter. **J. Bacteriol.** 174(21): 6862-6871, 1992

HENNECKE, H. Rhizobial respiration to support symbiotic nitrogen fixation, p. 429–434. In C. Elmerich, A. Kondorosi, and W. E. Newton (ed.), **Biological nitrogen fixation for the 21st century**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1997.

HILL, S.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; JONES, T.; DIXON, R. *Azotobacter vinelandii* NifL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 2143-2148, 1996.

HUBBEL, D.H.; KIDDER, G. Biological nitrogen fixation. **IFAS Extension**: University of Florida, SL16, 2003.

HUMPHREY, W., DALKE, A. and SCHULTEN, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics", **J. Molec. Graphics**, vol. 14, pp. 33-38, 1996.

IMAMURA, R., YAMANAKA, K., OGURA, T, HIRAGA, S., FUJITA, N., ISHIHAMA, A., NIKI, H. Identification of the *cpdA* gene encoding cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate phosphodiesterase in *Escherichia coli*. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**. 271 (41) 225423-25429, 1996

ISHIDA, M.L., Yates, M.G., Souza, E.M. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil Biol. Biochem.** 29, 843–846, 1997.

JAMES, E. K.; OLIVARES F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 17, p. 77-119, 1998.

JONES, D.T. Protein secondary structure prediction based on position specific scoring matrices. **J. Mol. Biol.** 292, 195-202, 1999.

KANG, Y. WEBER, K.D. QIU, YU. KILEY, P J. BLATTNER, F. Genome-wide expression analysis indicates that FNR of *Escherichia coli* K12 regulates a large number of genes of unknown function. **J. Bacteriol.** 187, 1135 -1160, 2005.

KILEY, P. J., BEINERT, H. Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. **FEMS Microbiol. Rev.** 22: 341-352, 1999

KILEY, P.J. and REZNIKOJ, W.S. Fnr mutants that activate gene expression in the presence of oxygen. **J. Bacteriol.** 173, 16-22, 1991.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 887-891, 1997.

KLEYGERT, G, J., JONES, T, A. Phi/Psi-chology: Ramacahandran revisited. **Structure** 5, 1395 – 14000, 1996.

KLOPPROGGE, K.; GRABBE, R.; HOPPERT, M.; AND SCHMITZ, R.A. Membrane association of *Klebsiella pneumoniae* NifL is affected by molecular oxygen and combined nitrogen. **Arch. Microbiol.** 177(3): 223-34,2002.

KLOPPROGGE, K., and SCHMITZ, R.A. NifL of *Klebsiella pneumoniae*: redox characterization in relation to the nitrogen source. **Biochem. Biophys. Acta** 1431:462–470, 1990.

KHOROSHILOVA, N.; BEINERT, H.; AND KILEY, P.J. Association of a polynuclear iron-sulfur center with a mutant FNR protein enhances DNA binding. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92: 2499–2503,1995.

KOLB, A., BUSBY, S., BUC, H., GARGES, S. and ADHYA, S. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. **Annu. Rev. Biochem.** 62, 749-795, 1993.

KÖRNER, H., SOFIA, H.J., ZUMFT, W. G. Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcriptional regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. **FEMS Microbiol. Rev.** 27; 559-592, 2003.

KOPP J. and SCHWEDE T. The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models. **Nucleic Acids Research** 32, 230-234, 2004.

LAMBDEN, P.R. and GUEST, J.R. Mutants of *Escherichia coli* unable to use fumarate as an anaerobic electron acceptor. **J. Gen. Microbiol.** 97, 145-160, 1976.

LAZAZZERA, B.A., BATES, D.M. and KILEY, P.J. The activity of the *Escherichia coli* transcription factor FNR is regulated by a change in oligomeric state. **Genes Dev.** 7, 1993-2005, 1993.

LAZAZZERA, B.A.; BEINERT, H.; KHOROSHILOVA, N.; KENNEDY, M.C.; AND KILEY, P.I. DNA-binding and dimerization of the Fe-S containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. **J. Biol. Chem.** 271: 2762–2768, 1996.

LEI, S., PULAKAT, L., and GAVINI, N. Genetic analysis of *nif* regulatory genes by utilizing the yeast two-hybrid system detected formation of a NifLNifA complex that is implicated in regulated expression of *nif* genes. **J. Bacteriol.** 181:6535–6539, 1999.

LI, B., WING, H., LEE, D., WU, H.-C. and BUSBY, S. Transcription activation by *Escherichia coli* FNR protein: similarities to, and differences from, the CRP paradigm. **Nucleic Acids Res.** 26, 2075-2081, 1998.

LIU, J. and ROST, B. Domains, motifs and clusters in the protein universe. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 7, 5-11, 2003.

MCGUFFIN, L.J, BRYSON, K, JONES, D,T. The PSIPRED protein structure prediction server. **Bioinformatics.** 16, 404-405, 2000.

METTERT, E.L., KILEY, P.J. Contributions of [4Fe-4S]-FNR and Integration Host Factor to *fnr* transcriptional regulation. **J. Bacteriol.** 189: 3036-3043, 2007.

MCGUIRE, A.M., HUGHES, J.D. and CHURCH, G.M. Conservation of DNA regulatory motifs and discovery of new motifs in microbial genomes. **Genome Res.** 10, 744-757, 2000.

MONEY, T., JONES, T., DIXON, R.A., and AUSTIN, S. Isolation and properties of the complex between the enhancer binding protein NifA and the sensor NifL. **J. Bacteriol.** 181:4461–4468, 1999.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Expression and functional analysis of an N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Lett.**, v. 447, p. 283-286, 1999a.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. In-trans regulation of the N-truncated-NiFA protein of *Herbaspirillum seropedicae* by the N-terminal domain. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 180, p. 157-161, 1999b.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; WASSEM, R.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Inter-domain cross-talk controls the NifA protein activity of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Lett.**, v. 508, p. 1-4, 2001.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Fnr Is Involved in Oxygen Control of *Herbaspirillum seropedicae* N-Truncated NifA Protein Activity in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 1527-1531, 2002.

MORETT, E.; CANNON, W.; BUCK, M. The DNA-binding domain of the transcriptional activator protein NifA resides in its carboxy terminus, recognises the upstream activator sequence of the *nif* promoters and can be separated from the positive control function of NifA. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 11469-1488, 1988.

MORETT, E.; BUCK, M. NifA-dependent *in vivo* protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 9401-9405, 1988.

MORETT, E.; SEGOVIA, L. The σ^{54} Bacterial Enhancer Binding-Protein Family: Mechanism of Action and Phylogenetic Relationship of Their Functional Domains. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 6067-6074, 1993.

NOINDORF, L.; REGO, F.G.M.; BAURA, V.A.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.O.; AND CHUBATSU, L.S. Characterization of the *orf1glnKamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch. Microbiol.** v. 185, p. 55-62, 2005.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. **Biol. Fertil. Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.

PEDROSA, F.; YATES, G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr (gln)* type gene products. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 23, p. 95-101, 1984.

PERSUHN, D.C., SOUZA, E.M., STEFFENS, M.B.R., PEDROSA, F.O., YATES, M.G., RIGO, L.U. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.** 192, 217-221, 2000.

PIMENTEL, J. P.; OLIVARES, F.; PITARD, R. M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DOBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans*. and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant Soil**, v. 137, p. 61-65, 1991.

RAEDER, K. R. **Isolamento e caracterização do gene *fnr* de *Herbaspirillum seropedicae***. Dissertação de Mestrado em Ciências (Bioquímica). Editora da UFPR – Curitiba-Paraná, 2003.

REEDER, T., SCHLEIF, R. Mapping, sequence and apparent lack of function of *araJ*, a gene of the *Escherichia coli* arabinose regulon. **J. Bacteriol.** 173 (24); 7765-7771, 1991

RAMAKRISHNAN, C., and RAMACHANDRAN, G.N. Stereochemical criteria for polypeptide and protein conformations. II. Allowed conformations for a pair of peptide units. **Biophys J.** 5, 909-933, 1965.

REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Revs. Plant Sci.**, v.19, p.227-247, 2000.

RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M. Root colonization, systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedling. **Symbiosis**, v.35, p.261-270, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SAWERS, G., KAISER, M., SIRKO, A., FREUDLICH, M. Transcriptional activation by FNR and CRP: reciprocity of binding-site recognition. **Mol. Microbiol.** 23(4), 835-845, 1997

SAWERS, R.G., ZEHELEIN, E. and BOËCK, A. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of *Escherichia coli* proteins: influence of various anaerobic growth conditions and the *fnr* gene product on cellular protein composition. **Arch. Microbiol.** 149, 240-244, 1988.

SAWERS, R.G. Expression of *fnr* is constrained by an upstream IS5 insertion in certain *Escherichia coli* K-12 strains. **J. Bacteriol.** 187: 2609-2617, 2005.

SCHIMID, M., BALDANI, J. I., HARTMANN, A. The Genus *Herbaspirillum*. In: DWORKIN, D., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHEFLER, K-H., STACKBRANDT, E. **The Prokaryotes: a handbook on the Biology of**

Bacteria. Proteobacteria, Alpha and Beta subclasse. New York: Springer, 2006. 141-150. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/gx93396gt4k10352/>>. Acesso em 03/11/2008.

SCHULTZ, S.C., SHIELDS, G.C. and STEITZ, T.A. (1991) Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90°. **Science** 253, 1001-1007, 1991.

SCHWEDE T, KOPP J, GUEX N, and PEITSCH MC SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research** 31: 3381-3385, 2003.

SHALEL-LEVANON, S., SAN, K.Y., BENNETT, G.N. Effect of ArcA and FNR on the expression of genes related to oxygen regulation and the glycolysis pathway in *Escherichia coli* under microaerobic growth conditions. **Biotechnol. Bioeng.** 92: 147-159, 2005.

SILVA, F. de A. S. e. & AZEVEDO, C. A. V. de. **A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software.** In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais. Orlando: American Society of Agricultural Engineers. p.393-396, 2006.

SIMON, R.; PRIEFFER, U.; PUHLER, A. A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **BioTechnology**, v. 1, p. 784-791, 1983.

SHARROCKS, A., GREEN, J. and GUEST, J. In vivo and in vitro mutants of FNR the anaerobic transcriptional factor of *Escherichia coli*. **FEBS Lett.** 270, 119-122, 1990.

SHENG, Yuling. MANCINO, Valeria. BIRREN, Bruce. Transformation of *E.coli* with large DNA molecules by electroporation. **Nucleic Acids Research.** v.23, n.11, april. 1995.

SMITH, B.E. Nitrogenase reveals its inner secrets. **Science**, v.297, p.1654-1655, 2002.

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; MACHADO, H.B.; DRUMMOND, M.; YATES, M.G. The N-terminus of the NifA protein of *H. seropedicae* is probably involved in sensing of ammonia. In: **Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications.** TIKHONOVICH, I.A.; NIKOLAI, A.P.; VASSILY, I.R.; WILLIAM, E.N. eds. X International Congress in Nitrogen Fixation. St. Petersburg, p260, 1995.

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L.U.; YATES, M.G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA Activity by Ammonium Ions and Oxygen. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 681-684, 1999.

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC

and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiology**, v. 146, p. 1407-1418, 2000.

SPIRO, S. The FNR family of transcriptional regulators. **Antonie van Leeuwenhoek** 66: 23-36, 1994.

SPIRO, S.; AND GUEST, J.R. Regulation and over-expression of the *fnr* gene of *Escherichia coli*. **J. Gen. Microbiol.** 133: 3279-3288, 1987.

SPIRO, S.; AND GUEST, J.R. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Rev.** 75: 399-428, 1990.

SPIRO, S., GASTON, K.L., BELL, A.I., ROBERTS, R.E., BUSBY, S.J.W., GUEST, J.R., Interconversion of the DNA-binding specificities of two related transcriptional regulators, CRP and FNR. **Mol Microbiol** 4: 1831-1838, 1990.

THORNELEY, N.F.; LOWE, D.J. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. **Biochem. J.**, v.215, p.393-403, 1983.

UNDEN, G.; BONGAERTS, J.; BECKER, S.; HOLIGHAUS, G.; SCHIRAWSKI, J.; SIX, S. O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. **Arch. Microbiol.** 164: 81-90, 1995

WASSEM, R.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; BUCK M. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 756-764, 2000.

WASSEM, R.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; REGO, F. G. M.; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. U.; SOUZA, E. M. Control of autogenous activation of *Herbaspirillum seropedicae nifA* promoter by the IHF protein. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 212, p. 177-182, 2002.

WEBER, I.T. and STEITZ, T.A. Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP resolved at 2.5 Å resolution. **J. Mol. Biol.** 198, 311-326, 1987.

WESTBROOK, J., FENG, Z., CHEN, L., YANG, H., BERMAN, H.M. The protein data bank and structural genomics. **Nucleic Acids Res.** 33: 489-491, 2003.

WOOTTON, J.C.; DRUMMOND, M. The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory protein. **Protein Eng.**, v. 2, p. 535-543, 1989.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H. ; EVANS, H. J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**. London: Chapman & Hall, New York, p. 43-86, 1992.